Reaktionskinetische Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Seryl- und Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus Hefe

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

des Fachbereichs Chemie und Pharmazie

der Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt von

LEIF DIBBELT

aus Düsseldorf

München 1981

Reaktionskinetische Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Seryl- und Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus Hefe

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

des Fachbereichs Chemie und Pharmazie

der Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt von

LEIF DIBBELT

aus Düsseldorf

München 1981

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.G. Zachau

2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Mai 1981

UNIV. LEIDEN BIBL.

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München in der Zeit von Januar 1976 bis Juni 1980 durchgeführt.

Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde veröffentlicht in: L. Dibbelt, U. Pachmann und H. G. Zachau, Nucl. Acids Res. 8, 4021 - 4039 (1980).

Allen, die dazu beigetragen haben, daß ich diese Arbeit anfertigen konnte, möchte ich herzlich danken. Mein Dank gilt insbesondere Herrn Prof. Dr. H. G. Zachau für die Förderung und sein Interesse an der Arbeit, Herrn Dr. U. Pachmann für Anregungen, Diskussionen und Mithilfe bei einigen Experimenten, Herrn Dr. R. Thiebe und Herrn Dr. W. Wintermeyer für Diskussionen und die Überlassung von $tRNA^{Phe}$, Herrn Prof. Dr. A. Kröger für die Erlaubnis, sein quenched-flow-Gerät benutzen zu dürfen, Herrn P. Schick und seinen Kollegen aus der Werkstatt für die sachkundige Hilfe bei Reparaturen des quenched-flow-Apparates und meiner Frau für die Mühe, die sie sich mit der Reinschrift des Manuskripts gemacht hat.

I N H A L T S A N G A B E

1. EINLEITUNG 1

2. VERSUCHE ZUR SPEZIFISCHEN FLUORESZENZMARKIERUNG VON PHENYLALANYL-tRNA-SYNTHETASE 5

2.1. Assoziative Markierung mit 6-(p-Toluidino)-naphthalin-2-sulfonat 5

2.1.1. Aminoacylierungskinetik in Gegenwart des Farbstoffs 6

2.1.2. Fluoreszenz-Titrationen mit 6-(p-Toluidino)-naphthalin-2-sulfonat als Fluorophor 8

2.2. Kovalente Markierung mit N-(3-Pyren)-maleinimid 1o

2.2.1. Kinetische Analyse der Markierungsreaktion .. 11

2.2.2. Markierung der Synthetase in Gegenwart der Substrate 17

2.3. Diskussion 19

3. UNTERSUCHUNGEN ZUR KINETIK DER AMINOACYLIERUNG VON $tRNA^{Ser}$ WÄHREND DER ANLAUFPHASE DER REAKTION. BESTIMMUNG VON GESCHWINDIGKEITSKONSTANTEN EINZELNER TEILSCHRITTE IM REAKTIONSMECHANISMUS VON SERYL-tRNA-SYNTHETASE 22

3.1. Methodische Vorarbeiten 23

3.1.1. Eichung des quenched-flow-Apparats 23

3.1.2. Bestimmung der spezifischen Aktivität der Synthetase für hohe Enzym-Konzentrationen ... 25

3.1.3. Bestimmung der Akzeptoraktivität bei hohen $tRNA^{Ser}$-Konzentrationen 25

3.1.4. Bestimmung der kinetisch optimalen Mg^{2+}-Konzentration 29

3.2. Kinetische Analyse des Reaktionsablauf an Seryl-tRNA-Synthetase 29

3.2.1. Substrat-Assoziationen 29

3.2.2. Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten ... 33

3.2.3. Serin-Aktivierung 37

3.2.4. Transfer des aktivierten Serins auf $tRNA^{Ser}$.. 42

3.2.5. Dissoziation von Seryl-$tRNA^{Ser}$ 46

3.3. Einfluß der Salzkonzentration auf die Geschwindigkeit der Aminoacylierung 48

4. AKTIVIERUNG UND TRANSFER VON SERIN: WEITERE CHARAKTERISIERUNG DER TEILREAKTIONEN 57

4.1. Kinetische Untersuchungen und Gleichgewichtsmessungen zur Aktivierung von Serin in Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$ 58

4.1.1. Isolierung des aktivierten Komplexes durch Bindung an Nitrocellulose-Filter 58

4.1.2. Konzentrationsabhängigkeiten des Aktivierungsgleichgewichts 64

4.1.3. Geschwindigkeit der Aktivierung in Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$. Stöchiometrie der ATP-Hydrolyse 7o

4.2. Transfer des aktivierten Serins auf $tRNA^{Ser}$: Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit der Transfergeschwindigkeit 77

4.3. Untersuchungen zur Aminosäurespezifität der Seryl-tRNA-Synthetase 89

5. UNTERSUCHUNGEN ZUR KINETIK DER AMINOACYLIERUNG VON $tRNA^{Phe}$ WÄHREND DER ANLAUFPHASE DER REAKTION. LOKALISIERUNG DES GESCHWINDIGKEITSBESTIMMENDEN TEILSCHRITTS IM REAKTIONSMECHANISMUS VON PHENYLALANYL-tRNA-SYNTHETASE 99

5.1. Kinetische Analyse des Reaktionsablaufs bei hohen Substratkonzentrationen 1oo

5.2. Untersuchungen zur Lokalisation des geschwindigkeitslimitierenden Schrittes der Aminoacylierung von $tRNA^{Phe}$ bei niedrigen Substratkonzentrationen 1o7

6. D I S K U S S I O N 11o

6.1. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Reaktionsmechanismus von Seryl- und Phenylalanyl-tRNA-Synthetase. Vergleich mit anderen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen 11o

6.2. Kinetik einzelner Teilschritte im Reaktionsmechanismus von Seryl-tRNA-Synthetase 113

6.3. Zum Mechanismus der Aktivierung von Serin. Ist Seryl-Adenylat das normale Intermediat bei der Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$?.. 126

6.4. Zum Reaktionsmechanismus von Phenylalanyl-tRNA-Synthetase. Vergleich mit Seryl-tRNA-Synthetase 129

6.5. Zur Aminosäure-Spezifität der Seryl-tRNA-Synthetase 133

7. MATERIALIEN UND METHODEN 137

7.1. Enzyme 137

7.2. tRNA 137

7.3. Chemikalien 139

7.4. Fluoreszenz-Markierungen 139

7.5. Quenched-flow-Messungen 14o

7.6. Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$ und $tRNA^{Phe}$ 14o

7.7. Pyrophosphat-Austausch 141

7.8. Messung der [γ-^{32}P]-ATP-Hydrolyse 141

7.9. Messung der [^{14}C]-ATP-Hydrolyse 142

7.1o. Nachweis von Enzym-gebundenem Seryl-Adenylat durch Adsorption an Nitrocellulose-Membranfilter 143

7.11. Berechnung der verwendeten Reaktionsmodelle.. 144

8. ZUSAMMENFASSUNG 147

9. Literaturverzeichnis 151

1o. Verzeichnis der Abkürzungen 159

1. EINLEITUNG

Aminoacyl-tRNA-Synthetasen katalysieren unter ATP-Hydrolyse die Veresterung von Aminosäuren mit einer Hydroxylgruppe des 3'-terminalen Adenosinrestes von tRNA-Molekülen (1, 2). Nach dem klassischen mechanistischen Konzept verläuft die Reaktion in zwei Schritten, der Aktivierung (I), die zur Bildung von Aminoacyl-Adenylat als stabilem Intermediat führt, und dem Transfer der aktivierten Aminosäure auf die tRNA (II):

$$E + AA + ATP \rightleftharpoons E \cdot AA\text{-}AMP + PP_i \qquad (I)$$

$$E \cdot AA\text{-}AMP + tRNA \rightleftharpoons E + AA\text{-}tRNA + AMP \qquad (II)$$

Durch die Bindung an tRNA-Moleküle werden die Aminosäuren für die ribosomale Proteinbiosynthese aktiviert. Für jede der 2o verschiedenen Aminosäuren existiert eine eigene Synthetase, die spezifisch nur die Umsetzung mit der zugehörigen tRNA katalysiert, die das richtige Anticodon besitzt. Daher findet gleichzeitig mit der Aminoacylierung auch die Entschlüsselung des Nucleinsäure-Codes statt.

Aminoacyl-tRNA-Synthetasen zeigen einen komplexen Wirkungsmechanismus. An der Aminoacylierung sind drei Substrate, darunter die tRNA als Makromolekül, drei Produkte und mindestens ein zweiwertiges Metallion beteiligt. Viele Synthetasen besitzen zwei Bindungsplätze für jedes Substrat und Wechselwirkungen zwischen diesen Bindungsstellen können die Aminoacylierung beeinflussen. Manche Synthetasen erreichen die notwendige Substratspezifität nur über zusätzliche Korrekturmechanismen. Ein umfassendes Verständnis des Reaktionsmechanismus der Synthetasen setzt eine genaue Kenntnis

der Topologie des aktiven Zentrums, der Struktur intermediärer Komplexe und der Kinetik der einzelnen Teilschritte der Aminoacylierung voraus.

Seryl-tRNA-Synthetase (SRS) und Phenylalanyl-tRNA-Synthetase (PRS) aus Hefe gehörten zu den ersten Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, die in reiner Form isoliert werden konnten (3). Beide Enzyme sind seitdem in mehreren Laboratorien mit Hilfe verschiedener experimenteller Techniken untersucht worden.

SRS besitzt ein Molekulargewicht von ca. 120000 (4 - 6) und besteht aus zwei, möglicherweise identischen, Untereinheiten (5, 7). Das Enzym bindet zwei Moleküle $tRNA^{Ser}$ (4, 6, 8), die Bindung der zweiten $tRNA^{Ser}$ erfolgt anticooperativ und wird sehr stark von der Ionenstärke, der Temperatur, dem pH-Wert und der ATP-Konzentration beeinflußt (6, 8 - 10). Die Kinetik der tRNA-Bindung läßt sich mit einem 2-Schritt-Modell beschreiben (10, 11): Auf eine rasche, unspezifische Rekombination der beiden Makromoleküle folgt eine langsame Umlagerung des spezifischen Synthetase-tRNA-Komplexes. SRS besitzt mindestens zwei spezifische Bindungsstellen für ATP (12) sowie eine Reihe unspezifischer Nukleotid-Bindungsplätze (13). Einige der für die spezifische Wechselwirkung mit der Synthetase wichtigen Bereiche der $tRNA^{Ser}$ und des ATPs sind bekannt (14 - 18). SRS zeigt eine komplizierte Abhängigkeit der Aminoacylierungsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration, möglicherweise kann unter Reaktionsbedingungen jedes Substrat mehr als eine Bindungsstelle besetzen (12, 19). Ebenso können Wechselwirkungen zwischen den Bindungsstellen (10, 20, 21) die Kinetik der Aminoacylierung beeinflussen.

PRS zeigt einen komplexeren Aufbau als die Serin-spezifische

Synthetase: Das Enzym hat ein Molekulargewicht von ca. 260000 und besteht aus vier Untereinheiten, zwei mit einem Molekulargewicht von ca. 63000, die beiden anderen von ca. 75000 (7, 22 - 24). Die Aminosäure-Zusammensetzung der Synthetase (25) und die Primärstruktur einzelner tryptischer Peptide (26) ist bekannt, diesen Daten zufolge sind die gleich großen Untereinheiten identisch. Die Synthetase besitzt zwei Bindungsstellen für jedes Substrat (6, 7, 12, 24, 27, 28); die Substratspezifität ist für tRNA (16, 29 - 31), Nukleotid (17) und Aminosäure (32) untersucht. Wie im SRS-$tRNA^{Ser}$-System verläuft auch die Bindung der $tRNA^{Phe}$ an die PRS nach einem 2-Schritt-Mechanismus (33). Unter Reaktionsbedingungen sind die jeweils doppelt vorhandenen Substrat-Bindungsplätze nicht gleichwertig, die Synthetase zeigt Halb-Seiten-Reaktivität (23, 34, 35). Die Reihenfolge von Substrat-Assoziationen und Produkt-Dissoziationen im quasi-stationären Zustand der Aminoacylierung ist bekannt (23, 36), die Synthese von Phenylalanyl-$tRNA^{Phe}$ kann, abhängig von der tRNA-Konzentration, auf zwei verschiedenen Reaktionswegen erfolgen.

Fluorimetrische Verfahren sind bereits für Untersuchungen zur Bindungskinetik der tRNA eingesetzt worden. Um auch Vorgänge an den Bindungsstellen der niedermolekularen Substrate fluorimetrisch verfolgen zu können und um zugleich topologische Messungen an der Synthetase durchführen zu können, sollte in der vorliegenden Arbeit zunächst der Versuch unternommen werden, PRS unter weitgehender Erhaltung der enzymatischen Aktivität selektiv an definierten Positionen mit fluoreszierenden Farbstoffen zu markieren.

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte der Reaktionsablauf an SRS und PRS mit Hilfe der quenched-flow-Methode untersucht werden. Die quenched-flow-Technik (ein spezielles Strömungs-

verfahren, für das es keine allgemein eingeführte deutsche Bezeichnung gibt) macht Reaktionszeiten im Millisekunden-Bereich zugänglich und ermöglicht somit kinetische Messungen während der Anlaufphase der Aminoacylierung (presteady-state). Das Ziel dieser Untersuchungen war es, Informationen über die Kinetik einzelner Teilschritte der Reaktion zu erhalten und den geschwindigkeitslimitierenden Schritt der Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$ und $tRNA^{Phe}$ zu lokalisieren. Aus den Ergebnissen der kinetischen Analyse sollten sich dann geeignete Modellvorstellungen über den katalytischen Mechanismus von SRS und PRS ableiten lassen.

2. VERSUCHE ZUR SPEZIFISCHEN FLUORESZENZMARKIERUNG VON PHENYLALANYL-tRNA-SYNTHETASE

Für fluorimetrische Untersuchungen an PRS und SRS aus Hefe ist bislang als Meßgröße entweder die natürliche Fluoreszenz der Proteine (4, 8, 1o, 11, 13, 33, 37), der tRNA (33, 38), oder die Fluoreszenz von Enzym- (7) oder tRNA-gebundenen (9, 39) Farbstoffen verwendet worden. Diese Messungen gaben im wesentlichen Aufschluß über Gleichgewicht und Kinetik der tRNA-Bindung. Für Vorgänge an den Bindungsstellen der niedermolekularen Substrate sind diese Fluoreszenzsignale nicht empfindlich. Um auch Bindung und Umsetzung von ATP und Aminosäure fluorimetrisch verfolgen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen, fluoreszierende Farbstoffe selektiv an definierte Stellen der Synthetase zu binden. Die Fluoreszenzmarkierung sollte sensitiv für katalytische Vorgänge am Enzym sein, die Aktivität des Enzyms jedoch nicht wesentlich beeinflussen. Zusätzlich sollte der Enzym-gebundene Farbstoff über Energie-Transfer-Messungen mit anderen Fluorophoren topologische Untersuchungen an der Synthetase erlauben. Die Experimente wurden mit PRS durchgeführt, da aufgrund der Literatur zwei Farbstoffe geeignet für die Markierung dieses Enzyms zu sein schienen.

2.1. Assoziative Markierung mit 6-(p-Toluidino)-naphthalin-2-sulfonat

TNS (Abb. 2.1.) zeigt wie eine Reihe verwandter Verbindungen bei Komplexbildung mit Proteinen einen erheblichen Anstieg der Fluoreszenzintensität und eine Blauverschiebung des Emissionsmaximums (4o, 41). Untersuchungen an organisch-chemischen Modellsystemen zufolge läßt sich dieses Verhalten im

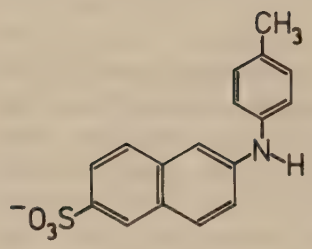
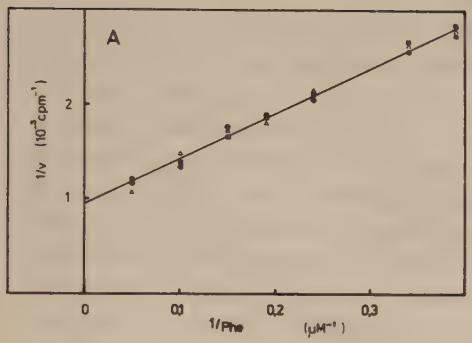


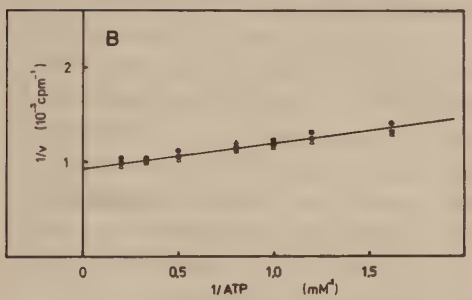
Abb. 2.1.: 6-(p-Toluidino)-naphthalin-2-sulfonat (TNS)

wesentlichen auf eine Destabilisierung des angeregten Zustandes bei Bindung des Farbstoffs in hydrophoben Bereichen eines Proteins (41 - 43) und auf Einschränkung intramolekularer Bewegung des Farbstoff-Moleküls im Komplex (4o, 44) zurückzuführen. E. Holler und H. M. Kosakowski gelang mit TNS eine assoziative Affinitätsmarkierung der PRS aus E.coli an der Aminosäure-Bindungsstelle (45, 46). Es bestand daher die Erwartung, auch das Hefe-Enzym mit TNS spezifisch markieren zu können.

2.1.1. Aminoacylierungskinetik in Gegenwart des Farbstoffs

Wenn TNS die Bindungsstelle für Phenylalanin besetzt, sollte es die Aminoacylierung kompetitiv zur Aminosäure hemmen. In reaktionskinetischen Experimenten (Abb. 2.2.) wurde jedoch weder bei Variation der Aminosäure- noch der ATP-Konzentration eine Hemmung bei Zusatz von TNS beobachtet, lediglich mit $tRNA^{Phe}$ als variiertem Substrat zeigte sich eine schwache nicht-kompetitive Inhibition (K_i = o,8 mM). In Kontrollexperimenten mit einem PRS-Rohenzym aus E.coli wurde die in





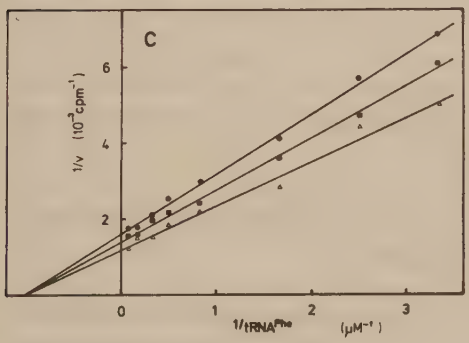


Abb. 2.2.:

Reaktionskinetik mit TNS als Inhibitor unter Variation der Konzentration von Phenylalanin (A), ATP (B) und $tRNA^{Phe}$ (C). Die Konzentration der nicht variierten Substrate betrug: ATP 5 mM, [^{14}C]-Phenylalanin 2o µM, $tRNA^{Phe}$ 12 µM, $MgCl_2$ 15 mM.

(△) ohne Zusatz von TNS,
(■) TNS o,1 mM,
(●) TNS o,21 mM.

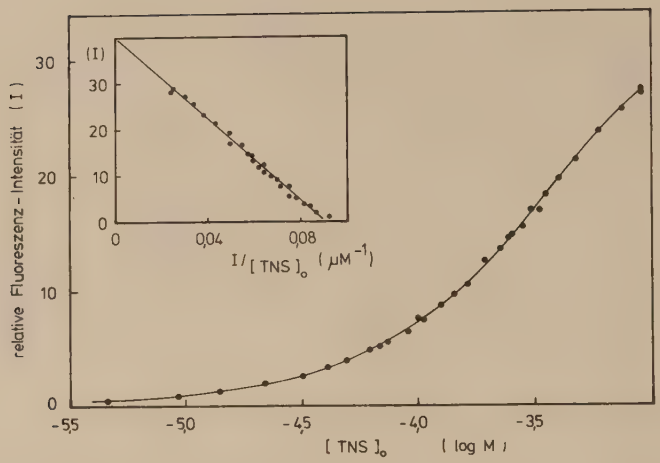


Abb. 2.3.: Fluoreszenz-Titration der Synthetase mit TNS. 1,2 µM PRS in 5o mM Tris, pH 7,o, 4 mM GSH, lo Vol.% Glycerin wurde schrittweise mit TNS in der gleichen Lösung versetzt. $[TNS]_o$ = Gesamtkonzentration in der Küvette. Anregung bei 366 nm, I = Fluoreszenzintensität bei 43o nm, korrigiert um den Beitrag des freien TNS. Meßtemperatur 25° C. Linearisierung der Meßdaten nach (47).

(46) beschriebene Kompetition zwischen TNS und Phenylalanin gefunden. Diese Ergebnisse zeigen, daß TNS nicht im aktiven Zentrum der PRS aus Hefe bindet.

2.1.2. Fluoreszenz-Titrationen mit 6-(p-Toluidino)-naphthalin-2-sulfonat als Fluorophor

Um die Bindung von TNS an die Synthetase genauer zu charakterisieren, wurde das Enzym mit TNS titriert und die Fluores-

zenz des Farbstoffs gemessen (Abb. 2.3.). Enzym-gebundenes TNS zeigte ein Emissionsmaximum bei 43o nm gegenüber 5oo nm für den freien Farbstoff, die Intensität der Fluoreszenz war erheblich gesteigert. Eine Sättigung der Synthetase mit TNS war wegen der begrenzten Löslichkeit des Farbstoffs nicht zu erreichen. Aus der linearisierten Auftragung der Meßwerte (Abb. 2.3.) wurde eine Dissoziationskonstante von 4×10^{-4} M ermittelt. Die graphische Darstellung der Meßdaten nach Scatchard (48), die für alle Titrationen eine starke Streuung der Meßpunkte aufwies, zeigte eine größere Anzahl von TNS-Bindungsplätzen ($n \geq 5o$) an, die Auftragung nach Hill (49) erbrachte keine Hinweise auf kooperative oder antikooperative Effekte ($n_{Hill} = o,995$). Die Affinität der Synthetase zu TNS konnte durch Variation des pH-Wertes oder Erhöhung der Ionenstärke nur geringfügig verändert werden (Tab. 2.1.).

Tab. 2.1.: Einfluß von pH-Wert und Ionenstärke auf die Komplexbildung zwischen TNS und Synthetase.

	$I/I_{7,o}$	K_D (M)
pH 6,5	1,25	$3,2 \times 10^{-4}$
pH 7,o	1,oo	$4,o \times 10^{-4}$
pH 8,8	1,52	$5,5 \times 10^{-4}$
pH 7,o o,2 M KCl	1,12	$2,8 \times 10^{-4}$

Experimentelle Bedingungen siehe Abb. 2.3. I = relative Fluoreszenz-Intensität bei 1 mM TNS, $I_{7,o}$ = dgl. bei pH 7,o.

Die Fluoreszenz-Intensität des PRS-TNS-Komplexes wurde durch Zusatz von ATP oder Phenylalanin nicht signifikant beeinflußt, durch Zugabe von $tRNA^{Phe}$ jedoch um 2o % verringert (Tab. 2.2.). Diese Ergebnisse stimmen mit den reaktionskinetischen Befunden in 2.1.1. überein und zeigen, daß die TNS-Fluoreszenz zwar empfindlich für Vorgänge bei der tRNA-Bindung ist, als Signal für Assoziations-Prozesse von ATP und Phenylalanin jedoch nicht dienen kann.

Tab. 2.2.: Einfluß der Substrate auf die Fluoreszenz des Enzym-gebundenen TNS.

Substrat		I
Phe	12,5 mM	o ± 2 %
ATP $MgCl_2$	12,5 mM 13,7	o ± 2 %
$tRNA^{Phe}$ $MgCl_2$	12 µM 13,7 mM	- 2o ± 3 %

I = Änderung der Fluoreszenz-Intensität, bezogen auf die Fluoreszenz einer Lösung von 1,3 µM PRS, 1 mM TNS, 5o mM Tris, pH 7,o, 4 mM GSH, 1o Vol.% Glycerin, bei 25° C. Angegeben sind Mittelwerte aus jeweils 2 unabhängigen Experimenten.

2.2. Kovalente Markierung mit N-(3-Pyren)-maleinimid

NPM (5o) kann wie andere N-substituierte Maleinimide zur Modifizierung von Proteinen verwendet werden. Die Reaktion verläuft über nukleophile Addition des Thiolat-Anions einer

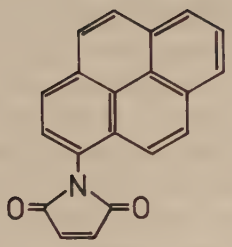


Abb. 2.4.: N-(3-Pyren)-maleinimid (NPM).

Cystein-Seitenkette an die C=C-Doppelbindung des Maleinimid-Ringes, bei pH-Werten über 7,5 können auch Aminogruppen des Proteins reagieren (51). Während freies NPM in wässriger Lösung praktisch keine Fluoreszenz zeigt, führt die Umsetzung mit Proteinen zu fluoreszierenden Derivaten (5o).

R. Hirsch und H.G. Zachau konnten PRS aus Hefe mit 2 - 2,5 NPM-Resten pro Synthetase-Molekül unter Verlust von 1o - 3o % der enzymatischen Aktivität markieren (7). Die Reaktion verlief jedoch nicht spezifisch, nur 3o - 4o % des gebundenen NPM wurden nach tryptischer Spaltung in einer einheitlichen Peptidfraktion gefunden, der Rest verteilte sich auf verschiedene Peptide. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit mit kinetischen Methoden untersucht, ob die Spezifität der Markierung durch Variation der Reaktionsbedingungen und Substrat-Zusatz erhöht werden kann.

2.2.1. Kinetische Analyse der Markierungsreaktion

Die Umsetzung der Synthetase mit NPM wurde fluorimetrisch verfolgt. Das Fluoreszenzspektrum des Addukts zeigte die für polycyclische Aromaten typische Bandenstruktur, die Emissionsmaxima lagen bei 376, 394 und 416 nm. Das Spektrum war bei pH-Werten von 6,o bis 7,8 in Phospat- oder Tris-Puffer über mindestens 24 Stunden stabil. Ein in analoger Weise hergestelltes NPM-Derivat des Serumalbumins (Rind) zeigte dagegen bei pH 7,5 schon nach wenigen Minuten eine Verschie-

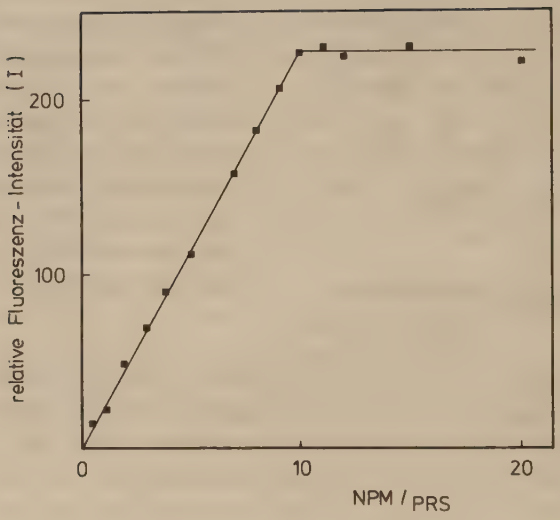


Abb. 2.5.: Fluoreszenz der markierten Synthetase nach Umsetzung mit steigenden Mengen NPM. PRS (o,4 µM) in 1oo mM Phosphat-Puffer, pH 6,8, die Abszisse gibt das für die Markierung eingesetzte Verhältnis von NPM-Molekülen pro Synthetase an. Anregung bei 341 nm, Emission gemessen bei 376 nm, die angegebenen Fluoreszenz-Intensitäten sind Endwerte nach 9o - 12o min Reaktion. Reaktions- und Meßtemperatur 25° C.

bung der Absorptions- und Emissionsmaxima zu größeren Wellenlängen. Nach (52) beruht diese Verschiebung auf einer intra- oder intermolekularen Amidolyse, die zur Öffnung des Succinimid-Ringes und zu einer Vernetzung der Proteinmoleküle führt. Diese Sekundärreaktion ist bei der PRS aus steri-

schen Gründen oder wegen mangelnder Reaktivität benachbarter Aminogruppen offenbar nicht möglich.

Bei der Umsetzung der Synthetase mit steigenden Mengen an NPM nahm die Fluoreszenz-Intensität im Endpunkt der Reaktion linear mit der NPM-Konzentration zu (Abb. 2.5.). Dieser Befund zeigt, daß der Intensitätsbeitrag des einzelnen gebundenen NPM-Moleküls kaum von der Umgebung des jeweiligen Bindungsortes beeinflußt wird. Die maximale Anzahl modifizierbarer SH-Gruppen lag reproduzierbar bei 1o (Abb. 2.5.). Nach (25) besitzt die native PRS 17 mit DTNB titrierbare Thiolgruppen. Möglicherweise reagiert NPM nicht mit jeder dieser Gruppen oder die für die Umsetzung mit NPM notwendige Vorbehandlung der Synthetase (s. Methoden) führt zu einem veränderten Redox-Zustand des Enzyms.

Kinetische Experimente, in denen die Zunahme der Fluoreszenz-Intensität verfolgt wurde, ergaben eine deutliche Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit der Markierungsreaktion von der Farbstoffkonzentration (Abb. 2.6.). Auch die Enzymaktivität nahm mit steigender NPM-Konzentration stärker ab (Abb. 2.6.), bei 2o-fachem Überschuß an Farbstoff wurde nach 5 Minuten ein Aktivitätsverlust von 2o % beobachtet. Um einen Anhaltspunkt für die Anzahl der in der Anfangsphase der Reaktion markierten SH-Gruppen zu erhalten, wurde die Zeitkurve der Umsetzung nach

$$v = k\,[PRS]\,[NPM]^n$$
$$\log v = \log k + \log [PRS] + n \log [NPM]$$

ausgewertet. Die Auftragung des Logarithmus der Reaktionsgeschwindigkeit gegen den Logarithmus der Konzentration an freiem NPM gibt zwar nicht die richtigen Werte für die An-

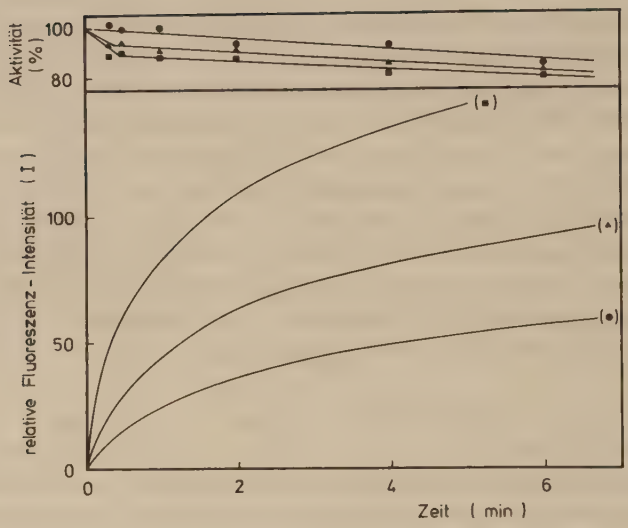


Abb. 2.6.: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz-Intensität und der enzymatischen Aktivität bei der Umsetzung von PRS (o,7 µM) mit verschiedenen NPM-Konzentrationen: 1,4 µM (●), 2,8 µM (▲) und 14 µM (■). Reaktion in loo mM Phosphat-Puffer, pH 6,8, bei 25° C. Anregung bei 341 nm, Emission gemessen bei 376 nm. Parallel zu den Fluoreszenz-Kinetiken wurde die Aktivität der PRS im Aminoacylierungstest bestimmt. Konzentrationen im Test:
PRS 3,5 nM, ATP 5 mM, [^{14}C]-Phenylalanin 2o µM, $tRNA^{Phe}$ 12 µM, $MgCl_2$ 15 mM.

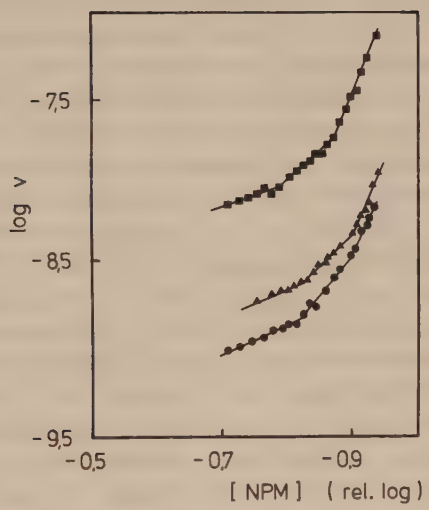


Abb. 2.7.: Graphische Auswertung der Markierungs-Zeitkurven von Abb. 2.6. Die Abszisse gibt den relativen Logarithmus der freien NPM-Konzentration an, normiert nach:

$$\text{rel. log } [NPM] = 1 + \log \frac{[NPM]_t}{[NPM]_o}$$

zahl der an der Reaktion beteiligten NPM-Moleküle und die Geschwindigkeitskonstante, da wichtige Voraussetzungen für die korrekte Anwendung des einfachen Auswertungsverfahrens nicht erfüllt sind. Die so erhaltenen Werte von n und k können jedoch als relative Bezugsgrößen Änderungen in der Kine-

tik der Markierungsreaktion bei Variation der Reaktionsbedingungen anzeigen. Die Auswertung der Zeitkurven von Abb. 2.6. ergab für alle NPM-Konzentrationen einen mehrphasigen Reaktionsverlauf (Abb. 2.7.). Die erste Phase ist charakterisiert durch Geradenabschnitte mit Steigungen von 7 - 8. Sie läßt sich als schnelle Reaktion von NPM mit leicht zugänglichen, reaktiven SH-Gruppen interpretieren. Die Steigungen nehmen in den folgenden Phasen der Reaktion ab, was auf geringere Reaktivität oder schlechtere Zugänglichkeit der beteiligten SH-Gruppen schließen läßt. Möglicherweise limitiert auch eine langsame Konformationsumwandlung der Synthetase, in deren Verlauf weitere SH-Gruppen freigesetzt werden, die Geschwindigkeit in den späteren Phasen der Reaktion. Die anfangs zitierten Angaben zur Spezifität der Markierung (7) waren an einem Addukt gewonnen worden, das aus einer schon während der ersten Reaktionsphase abgebrochenen Umsetzung mit NPM stammte. Daher wurde in den folgenden Experimenten vor allem der Einfluß veränderter Reaktionsbedingungen auf die Kinetik der schnellen Anfangsreaktion untersucht.

Da die Konzentration an Thiolat-Anionen als der reaktiven Gruppierung pH-abhängig ist, wurde bei pH 6,o eine deutlich verminderte, bei pH 7,8 eine erhöhte Geschwindigkeit der Markierungsreaktion beobachtet. Auf die Mehrphasigkeit der Reaktion und auf die kinetischen Konstanten der ersten Reaktionsphase hatte die pH-Variation jedoch keinen Einfluß. Bei pH 7,8 nahm die Aktivität der Synthetase während der Umsetzung mit NPM schneller ab. Zugabe von o,3 M KCl beeinflußte die Markierung nicht signifikant.

2.2.2. Markierung der Synthetase in Gegenwart der Substrate

Reaktionsverlauf und Aktivitätsverlust bei der Umsetzung der Synthetase mit NPM wurden durch Zusatz verschiedener Substrate der PRS unterschiedlich beeinflußt (Tab. 2.3.).

Tab. 2.3.: Einfluß der Substrate auf Intensitätsverlauf und Aktivitätsabnahme bei der Umsetzung von PRS mit NPM.

Substrate	Fluoreszenz-Intensität nach Reaktionszeiten von		PRS-Aktivität nach Reaktionszeiten von	
	2 min	5 min	2 min	5 min
-----	1oo %	1oo %	9o %	83 %
Phe 5 mM	12o %	118 %	9o %	8o %
CTP 36 mM	11o %	113 %	87 %	8o %
$MgCl_2$ 5o mM	1oo %	1oo %	9o %	8o %
ATP 5 mM $MgCl_2$ 5,5 mM	85 %	83 %	9o %	85 %
$tRNA^{Phe}$ 12 µM $MgCl_2$ 5,5 mM	87 %	83 %	93 %	87 %
ATP 5 mM $tRNA^{Phe}$ 12 µM $MgCl_2$ 5,5 mM	85 %	79 %	93 %	9o %
ATP 5 mM Phe 5 mM $tRNA^{Phe}$ 12 µM $MgCl_2$ 5,5 mM	8o %	65 %	95 %	9o %

Experimentelle Bedingungen: o,4 µM PRS, 1,5 µM NPM, 1oo mM Phosphat-Puffer pH 6,8. Anregung 341 nm, Emission 376 nm. Temperatur 25° C. Bezugsgröße für die Intensitätsangaben ist die Fluoreszenz-Intensität bei Reaktion ohne Substrat-Zusatz, die zu den jeweiligen Zeitpunkten als 1oo % angesetzt wurde. Konzentrationen im Aminoacylierungstest s. Abb. 2.6.

Tab. 2.4.: Einfluß der Substrate auf die kinetischen Parameter der Markierungsreaktion.

Substrate	1. Phase n	1. Phase k	2. Phase n	2. Phase k	3. Phase n	3. Phase k
-----	7,4-8,3	42-47	3,8-5,4	21-29	1,8-2,8	9-14
Phe 5 mM	7,5	43	4,2	24	2,6	13
ATP 5 mM $MgCl_2$ 5,5 mM	8,o	45	4,7	28	--	--
$tRNA^{Phe}$ 12 µM $MgCl_2$ 5,5 mM	7,9	44	4,7	26	--	--
ATP 5 mM $tRNA^{Phe}$ 12 µM $MgCl_2$ 5,5 mM	7,7	43	4,o	21	--	--
ATP 5 mM Phe 5 mM $tRNA^{Phe}$ 12 µM $MgCl_2$ 5,5 mM	7,3	39	4,5	24	--	--

Definition der Reaktionsphasen und der Parameter n und k siehe 2.2.1. und Abb. 2.7.

Die Markierung der Synthetase in Gegenwart von ATP und $tRNA^{Phe}$ sowie die Umsetzung unter Aminoacylierungsbedingungen führten zu einem verminderten Einbau von NPM unter weitgehendem Erhalt der enzymatischen Aktivität. Dagegen waren sowohl der Einbau von NPM als auch der Aktivitätsverlust der Synthetase bei Zusatz von Phenylalanin oder von CTP als unspezifischem Nukleotid erhöht im Vergleich zur Markierung in Abwesenheit der Substrate. Die Auswertung der Markierungs-

kinetiken nach dem in 2.2.1. angegebenen Verfahren zeigte, daß der Substratschutz durch ATP, $tRNA^{Phe}$ oder Aminoacylierungsbedingungen auf einer Unterdrückung der langsamsten beobachteten Phase der Markierungsreaktion beruhte (Tab. 2.4.). Die kinetischen Parameter der schnellen Anfangsreaktion waren dagegen kaum beeinflußt. Möglicherweise wird unter den genannten Bedingungen eine langsame Auffaltung der Synthetase, die weitere SH-Gruppen für NPM zugänglich macht, behindert. Vergleicht man die Fluoreszenz-Intensitäten nach einer Reaktionsdauer von 12o min, so sind gegenüber der Markierung in Abwesenheit der Substrate bei Zusatz von ATP und $tRNA^{Phe}$ etwa 15 %, in Anwesenheit aller Substrate etwa 3o % der mit NPM modifizierbaren SH-Gruppen geschützt. Reaktionen von NPM mit ß-Mercaptoäthanol oder Glutathion wurden durch Zusatz von ATP, Phenylalanin oder $tRNA^{Phe}$ nicht beeinflußt.

Titrationen einer Synthetase, die ohne Substrat-Zusatz mit NPM modifiziert worden war, mit ATP oder Phenylalanin zeigten keine signifikante Änderung der Fluoreszenz-Intensität. Offensichtlich ist auch das über die Reaktion mit NPM eingeführte Fluoreszenzsignal nicht geeignet, um Reaktionen an den Bindungsstellen der PRS für die niedermolekularen Substrate zu verfolgen.

2.3. Diskussion

Das angestrebte Ziel, mit Hilfe von Fluoreszenzmarkierungen der PRS ein physikalisches Signal einzuführen, das die Untersuchung der Bindungskinetik der niedermolekularen Substrate und weiterer Teilreaktionen der Aminoacylierung ermöglicht, wurde nicht erreicht. Weder der TNS-PRS-Komplex noch das NPM-Derivat der Synthetase zeigten bei Zusatz von

ATP oder Phenylalanin eine Veränderung des jeweiligen Fluoreszenzsignals.

TNS, das von der PRS aus E.coli spezifisch mit hoher Affinität an der Bindungsstelle für Phenylalanin gebunden wird, besetzt am Hefe-Enzym mit geringer Affinität eine größere Anzahl unspezifischer Bindungsplätze. Offensichtlich diskriminiert das eukaryontische Enzym besser gegen TNS als die prokaryontische Synthetase. Da TNS aufgrund seiner molekularen Struktur bevorzugt in unpolarer Umgebung bindet (4o), besitzt die PRS aus Hefe möglicherweise größere hydrophobe Bereiche an ihrer Oberfläche.

NPM reagiert mit SH-Gruppen der Synthetase. Die kinetischen Experimente zeigen eine deutliche Abstufung in der Reaktivität dieser Gruppen. Die Ergebnisse lassen sich dahingehend interpretieren, daß nach einer ersten schnellen Umsetzung frei zugänglicher Cystein-Seitenketten mit NPM die Geschwindigkeit der weiteren Modifizierung durch langsame Umlagerungen der Synthetase limitiert ist. Die Bindung von Substraten an die Synthetase beeinflußt den langsamen Teil der Markierungsreaktion. Wahrscheinlich sind in Gegenwart der Substrate bestimmte Konformationen des Enzyms stabil. Auf die Selektivität der Markierung während der schnellen Anfangsreaktion, die nach (7) nur gering ist, hat die Gegenwart der Substrate den kinetischen Experimenten zufolge kaum einen Einfluß. Da die Aktivität der Synthetase während der Markierung weitgehend erhalten blieb, sind die modifizierten SH-Gruppen für die Aminoacylierung offenbar nicht von Bedeutung.

Die geringe Spezifität der Markierung sowohl bei der Komplexbildung mit TNS als auch bei der kovalenten Modifizie-

rung mit NPM verhinderte auch eine Verwendung des Fluoreszenz-markierten Enzyms für Untersuchungen zur Topologie der Synthetase.

3. UNTERSUCHUNGEN ZUR KINETIK DER AMINOACYLIERUNG VON $tRNA^{Ser}$ WÄHREND DER ANLAUFPHASE DER REAKTION. BESTIMMUNG VON GESCHWINDIGKEITSKONSTANTEN EINZELNER TEILSCHRITTE IM REAKTIONSMECHANISMUS VON SERYL-tRNA-SYNTHETASE

Die quenched-flow-Technik ermöglicht eine kinetische Analyse schneller Reaktionen auch dann, wenn diese nicht über die Änderung eines physikalischen Signals wie etwa der Fluoreszenz verfolgt werden können. Bei diesem Verfahren wird mit Hilfe spezieller Geräte die Reaktion durch rasches Mischen der Reaktionspartner gestartet und nach kurzen Zeitintervallen durch Zugabe einer geeigneten Lösung, z.B. Säure, wieder gestoppt. Mit entsprechenden Analysemethoden wird dann die Konzentration an Produkt, Intermediat oder Ausgangsstoff bestimmt. Reaktionszeiten von wenigen Millisekunden bis zu mehreren hundert Millisekunden lassen sich auf diese Weise exakt messen, mit besonderen Techniken sind auch längere Reaktionszeiten noch zugänglich. Somit können Reaktionen mit Halbwertszeiten im Millisekunden- bis Sekunden-Bereich analysiert werden.

Quenched-flow-kinetische Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen wurden erstmals von A. Fersht und Mitarbeitern an bakteriellen Synthetasen durchgeführt (53 - 56). Ein Ziel dieser Arbeiten war es, den experimentellen Nachweis der Gültigkeit des klassischen 2-Schritt-Mechanismus der Aminoacylierung mit Aminoacyl-Adenylat als Intermediat zu führen, der vor allem durch Veröffentlichungen aus dem Arbeitskreis von R. Loftfield (57) in Frage gestellt worden war. Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Charakterisierung hydrolytischer Reaktionen zur Korrektur der Fehlbeladung von tRNA. Ebenfalls mit Hilfe der

quenched-flow-Technik untersuchten auch U. Lagerkvist und Mitarbeiter an einigen Synthetasen die Frage, ob Aminoacyl-Adenylat das normale Intermediat der Aminoacylierungsreaktion ist (58).

Die eigenen quenched-flow-kinetischen Experimente mit Seryl-tRNA-Synthetase aus Hefe wurden in der Absicht durchgeführt, möglichst vollständig alle im zugänglichen Zeitbereich ablaufenden Teilprozesse der Aminoacylierung zu identifizieren und ihre Geschwindigkeitskonstanten zu bestimmen. Auf diese Weise sollten auch Informationen über den geschwindigkeitsbegrenzenden Teilschritt im Reaktionsmechanismus der SRS gewonnen werden, der bislang nicht eindeutig lokalisiert werden konnte (1o, 19, 37).

3.1. Methodische Vorarbeiten

Der Zeitbereich, in dem das verwendete quenched-flow-Gerät (s. Methoden) korrekt funktionierte, wurde anhand einer Eichreaktion ermittelt. Außerdem wurden die Aktivität der Synthetase und die Beladbarkeit der $tRNA^{Ser}$ bei den benötigten hohen Konzentrationen kontrolliert und die kinetisch optimale Mg^{2+}-Konzentration bestimmt.

3.1.1. Eichung des quenched-flow-Apparats

Die Eichung wurde mit Hilfe der alkalischen Hydrolyse von Essigsäure-2,4-dinitrophenylester nach (59, 6o) durchgeführt. Die Reaktion ist bei hohem Überschuß an OH^- - Ionen pseudo-erster Ordnung. Wurde die unter diesen Bedingungen gemessene Geschwindigkeitskonstante (Abb. 3.1.) durch die Konzentration an OH^--Ionen geteilt, so ergab sich eine Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion zweiter Ordnung von

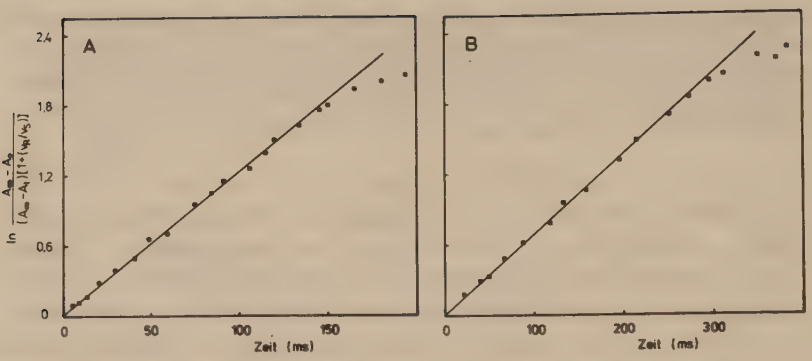


Abb. 3.1.: Kinetik der alkalischen Hydrolyse von Essigsäure-2,4-dinitrophenylester. Das quenched-flow-Gerät wurde in zwei Betriebszuständen benutzt, die sich im Volumen der Reaktionskammer (v_R) unterscheiden und dadurch verschiedene Zeitbereiche für die Messung zugänglich machen. (A) v_R = 35,2 µl. Gleiche Volumina Ester (o,94 mM in 3 mM HCl, 4o Vol.% n-Propanol) und KOH (o,5 M) wurden rasch gemischt, Volumen der Reaktionslösung (v_s) 2,39 ml. Nach den angegebenen Zeiten wurde die Reaktion mit 1,5 M HCl gestoppt und die Konzentration an 2,4-dinitrophenol durch Messung der Absorption bei 366 nm (A_t) bestimmt. A_o: Leerwert der Absorption, A_∞: Absorption nach vollständiger Hydrolyse des Esters. Anfangssteigung der Zeitkurve: 12,5 s^{-1}. (B) v_R = 72,7 µl, KOH-Konzentration o,28 M, sonst wie unter (A). Anfangssteigung der Zeitkurve: 7 s^{-1}. Meßtemperatur 21° C. Details der Messung siehe Methoden und (6o).

5o $M^{-1}s^{-1}$. Der in (59) angegebene Wert beträgt 49,4 $M^{-1}s^{-1}$. Abb. 3.1. zeigt, daß der quenched-flow-Apparat im Zeitbereich von etwa 8 - 3oo ms zuverlässig funktioniert. Die Streuung der Meßpunkte bei diesen Experimenten wie auch bei den nachfolgenden Aminoacylierungs-Kinetiken betrug etwa $\pm$ 3 % bei Verwendung derselben Lösungen der Reaktanden innerhalb einer Versuchsreihe.

3.1.2. Bestimmung der spezifischen Aktivität der Synthetase für hohe Enzym-Konzentrationen

SRS aus Hefe zeigt bei niedrigen Enzym-Konzentrationen ($\lesssim 10^{-8}$ M) einen ausgeprägten Abfall der spezifischen Aktivität, wahrscheinlich aufgrund einer Dissoziation in Untereinheiten (7). Da in den quenched-flow-Experimenten SRS in hohen Konzentrationen eingesetzt werden mußte, wurde die spezifische Aktivität der Synthetase bei Enzym-Konzentrationen von 10^{-8} bis 10^{-5} M bestimmt (Abb. 3.2.). Signifikante Änderungen wurden nicht beobachtet. Dieser Befund erlaubt den direkten Vergleich kinetischer Konstanten, die bei verschiedenen SRS-Konzentrationen gewonnen wurden. Offensichtlich treten Enzym-Assoziationen im untersuchten Konzentrationsbereich nicht auf oder sie beeinflussen nicht die spezifische Aktivität.

3.1.3. Bestimmung der Akzeptoraktivität bei hohen $tRNA^{Ser}$-Konzentrationen

$tRNA^{Ser}$ bildet leicht Aggregate, in denen sie nur beschränkt beladbar ist (61, 62). Um den Anteil aminoacylierbarer tRNA-Moleküle bei hohen $tRNA^{Ser}$-Konzentrationen, wie sie für die quenched-flow-Experimente nötig sind, zu ermitteln, wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Akzeptoraktivität be-

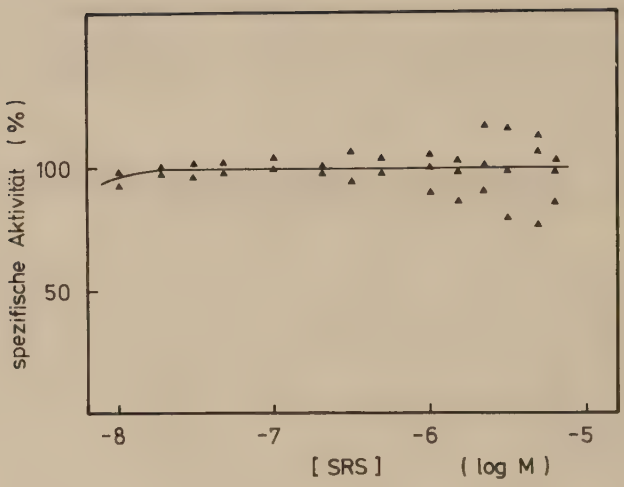


Abb. 3.2.: Spezifische Aktivität der Seryl-tRNA-Synthetase bei hohen Enzymkonzentrationen. Die Reaktionslösung enthielt: o,15 mM ATP, 1,5 mM $MgCl_2$, o,1 mM [^{14}C]-Serin, 25 µM $tRNA^{Ser}$. Die Synthetase-Konzentration wurde nach (19) bestimmt. Inkubationszeiten von 2 s bis 3o min.

stimmt (Abb. 3.3.). Die $tRNA^{Ser}$ akzeptierte in verdünnten Lösungen etwa 1,3 nMol Serin/A_{26o}-Einheit, durch spezielle Vorbehandlung nach (62) (s. Abb. 3.3.) konnte auch bei tRNA-Konzentrationen von 2o A_{26o}-Einheiten/ml im Test noch eine Beladung von 1,1 nMol Serin/A_{26o}-Einheit erzielt werden.

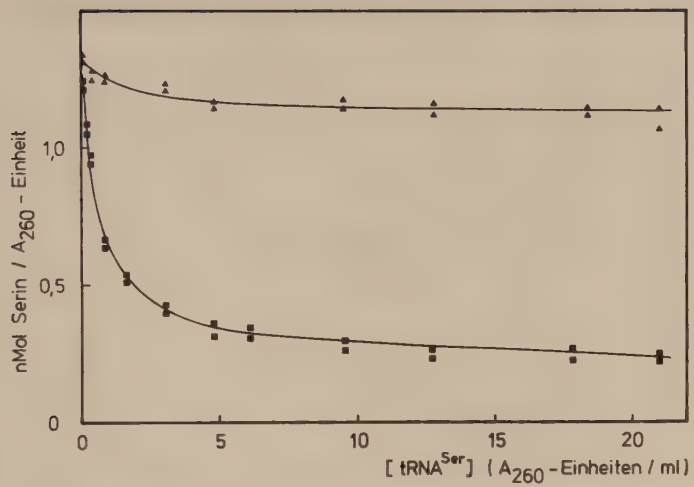


Abb. 3.3.. Abhängigkeit der Akzeptoraktivität von der $tRNA^{Ser}$-Konzentration. (■) $tRNA^{Ser}$ in 5o mM Tris-Puffer, pH 7,o, 5 mM $MgCl_2$, o,5 mM EDTA ohne Vorbehandlung im Beladungstest eingesetzt. (▲) $tRNA^{Ser}$ vor der Beladung in 1o mM Kakodylat-Puffer, pH 7,o, 5 mM $MgCl_2$, o,5 mM EDTA, 5 min bei 6o° C erwärmt. Konzentrationen im Beladungstest: 5 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$, o,5 mM [^{14}C]-Serin, o,1 µM SRS. Angegeben sind die Plateau-Werte der Beladung.

Dieser Wert liegt den Konzentrationsangaben für $tRNA^{Ser}$ bei den folgenden Versuchen zugrunde.

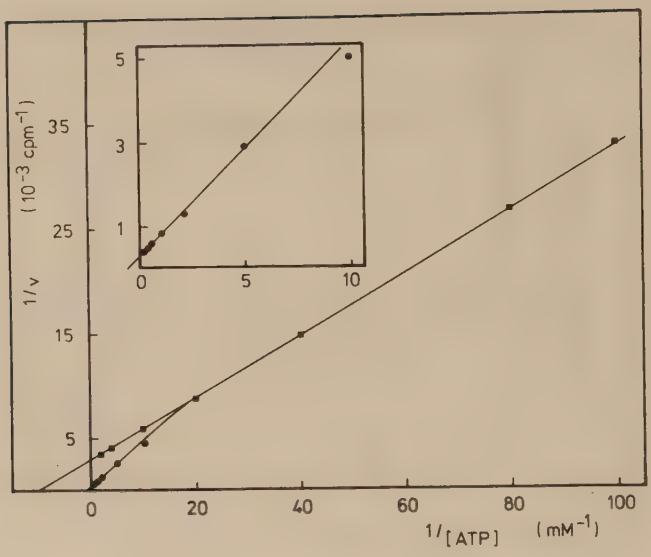


Abb. 3.4.: Einfluß der $MgCl_2$-Konzentration auf die Anfangsgeschwindigkeit der Aminoacylierung und den K_M-Wert für ATP. (■) $MgCl_2$-Konzentration 3 mM über der ATP-Konzentration. (●) Kinetisch optimale $MgCl_2$-Konzentration: 1,5 mM bei 5o - 25o µM ATP, 1,7 mM bei o,5 mM ATP, 2 mM bei 1 mM ATP, 5 mM bei 5 mM ATP, 25 mM bei 25 mM ATP. Die Konzentration der nicht variierten Substrate betrug: [^{14}C]-Serin o,5 mM, $tRNA^{Ser}$ 2o µM. Die eingezeichnete Abbildung zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des Kurvenverlaufs bei kinetisch optimaler $MgCl_2$-Konzentration.

3.1.4. Bestimmung der kinetisch optimalen Mg^{2+}-Konzentration

Die Aktivität der Synthetase wird in komplexer Weise von der Mg^{2+}-Konzentration beeinflußt (12, 19). Für verschiedene ATP-Konzentrationen wurde deshalb die Abhängigkeit der Aminoacylierungsgeschwindigkeit von der Mg^{2+}-Konzentration gemessen und das für hohe Geschwindigkeiten optimale ATP/Mg^{2+}-Verhältnis ermittelt. Dieses Verhältnis war etwa 1 : 1 für ATP-Konzentrationen von 1 mM und höher, der K_M-Wert für ATP unter diesen Bedingungen war 1,6 mM (Abb. 3.4.). Bei Mg^{2+}-Überschuß verringerte sich die Geschwindigkeit der Aminoacylierung, der K_M-Wert für ATP betrug hingegen 100 µM, übereinstimmend mit früheren Ergebnissen (12). Sofern nicht anders angegeben, wurde für die folgenden Versuche die Mg^{2+}-Konzentration immer so eingestellt, daß eine optimale Geschwindigkeit der Aminoacylierung resultierte.

3.2. Kinetische Analyse des Reaktionsablaufs an Seryl-tRNA-Synthetase

Um Informationen über die Dauer einzelner Schritte im Reaktionsmechanismus der Synthetase zu erhalten, wurde ausgehend von verschiedenen Enzym-, Substrat- oder Intermediat-Komplexen der Zeitverlauf der Produktbildung während der Anlaufphase der Aminoacylierung gemessen und quantitativ ausgewertet.

3.2.1. Substrat-Assoziationen

Seryl-tRNA-Synthetase wurde im quenched-flow-Apparat mit einer Lösung von ATP, Serin und $tRNA^{Ser}$ gemischt und die Zeitkurve der Bildung von Seryl-$tRNA^{Ser}$ wurde bestimmt (Abb. 3.5.).

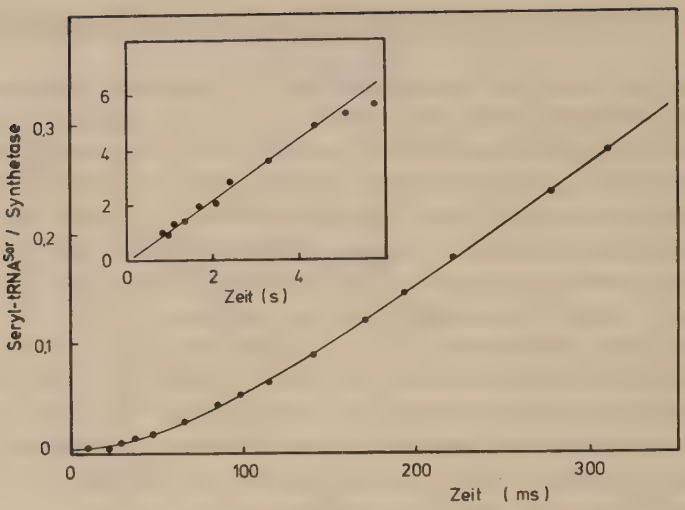


Abb. 3.5.: Zeitkurve der Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$ während der Anlaufphase der Reaktion. 3oo µl SRS (6 µM) wurden im quenched-flow-Apparat bei 21° C mit einem gleichgroßen Volumen $tRNA^{Ser}$ (42 µM), [^{14}C]-Serin (1 mM), ATP (1o mM) und $MgCl_2$ (1o mM) gemischt. Nach den angegebenen Zeiten wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 %iger TCA gestoppt und die Ausbeute an [^{14}C]-Seryl-$tRNA^{Ser}$ bestimmt. Die eingezeichnete Abbildung zeigt die Kinetik der Aminoacylierung im quasi-stationären Zustand unter den gleichen Bedingungen, aber bei 1o-fach geringerer Synthetase-Konzentration.

Meßbare Mengen an beladener $tRNA^{Ser}$ traten erst nach einer Induktionszeit (lag-Phase) von etwa 3o ms auf. Die Geschwindigkeit der Produktbildung stieg dann an, bis nach etwa 15o ms die Geschwindigkeit der Aminoacylierung im quasi-stationären Zustand erreicht war. Danach blieb die Geschwindigkeit im meßbaren Zeitbereich konstant. Präinkubation der Synthetase mit Substraten in allen nicht-produktiven Kombinationen führte zu einer signifikanten Verkürzung der Induktionszeit bei ansonsten gleicher genereller Form der Zeitkurve (Abb. 3.6.). Die Induktionszeit betrug bei Präinkubation mit Serin, $tRNA^{Ser}$ oder Serin und $tRNA^{Ser}$ etwa 25 ms, mit ATP und $tRNA^{Ser}$ etwa 15 ms, mit ATP allein etwa 1o ms. Präinkubation der Synthetase mit $MgCl_2$ allein führte zu keinen signifikanten Änderungen der Induktionszeit, daher kann der ausgeprägte ATP-Einfluß auf die Länge der Induktionsphase nicht durch den Mg^{2+}-Gehalt der ATP-Lösung verursacht sein. Das Auftreten einer Induktionsphase zeigt die Existenz langsamer Schritte in der Reaktionssequenz bis zur Bildung der beladenen tRNA an. Da die Länge der Induktionszeit durch die Präinkubation der Synthetase mit ihren Substraten beeinflußt werden kann, muß ein Teil dieser langsamen Schritte in der Präinkubationsphase ablaufen können und daher mit der Substratbindung korreliert sein. Offensichtlich ist der mit der ATP-Bindung verknüpfte Prozeß der langsamste, da die Präinkubation der Synthetase mit ATP die stärkste Verkürzung der Induktionsphase bewirkt. Die mit den anderen Substratassoziationen zusammenhängenden Prozesse laufen, dem geringeren Einfluß der jeweiligen Präinkubation auf die Länge der Induktionsphase entsprechend, schneller ab. Detaillierte Informationen über die Geschwindigkeit der beteiligten Reaktionen lassen sich nur über eine quantitative Auswertung der Zeitkurven mit Hilfe von Modellberechnungen und Kurvenanpassungen gewinnen.

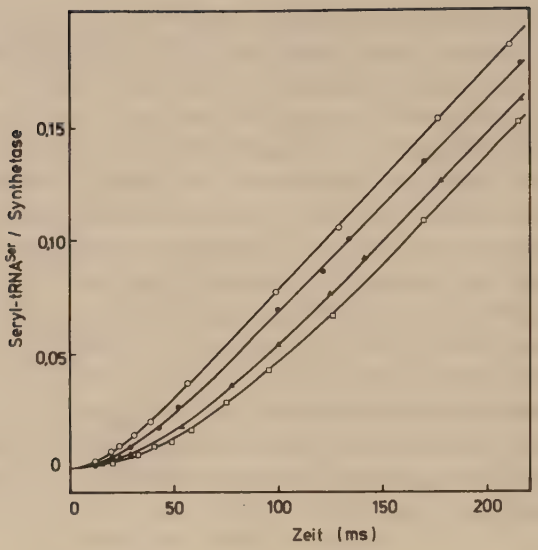


Abb. 3.6.: Zeitkurven der Aminoacylierung nach unterschiedlicher Substrat-Präinkubation der Synthetase. Durch 10 min Präinkubation bei 21° C wurden verschiedene Enzym-Substrat-Komplexe (a) gebildet, die dann im quenched-flow-Apparat mit den komplementären Substraten (b) gemischt wurden: (□) freie Synthetase, (a) 6 µM SRS, (b) 42 µM tRNA^{Ser}, 1 mM [^{14}C]-Serin, 10 mM ATP und 10 mM $MgCl_2$; (▲) SRS·tRNA^{Ser}·Serin-Komplex, (a) 6 µM SRS, 21 µM tRNA^{Ser} und 0,5 mM [^{14}C]-Serin, (b) 21 µM tRNA^{Ser}, 0,5 mM [^{14}C]-Serin, 10 mM ATP und 10 mM $MgCl_2$; (●) SRS·tRNA^{Ser}·ATP-Komplex, (a) 6 µM SRS, 21 µM tRNA^{Ser}, 5 mM ATP und 5 mM $MgCl_2$, (b) 21 µM tRNA^{Ser}, 1 mM [^{14}C]-Serin, 5 mM ATP und 5 mM $MgCl_2$; (○) SRS·ATP-Komplex, (a) 6 µM SRS, 5 mM ATP und 5 mM $MgCl_2$, (b) 42 µM tRNA^{Ser}, 1 mM [^{14}C]-Serin, 5 mM ATP und 5 mM $MgCl_2$.

3.2.2. Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten

Zu Beginn dieser Untersuchungen beschränkten sich die in der Literatur angegebenen Verfahren zur Auswertung von Zeitkurven mit einer Induktionsphase auf Angaben zur Länge der Induktionszeit, ermittelt über Extrapolation des linearen Anteils der Kurven. Daher mußte für die Berechnung von Geschwindigkeitskonstanten der in der Anlaufphase der Aminoacylierung ablaufenden Reaktionen ein eigenes Verfahren entwickelt werden. Das Reaktionsmodell, das dieser Berechnung zugrunde lag, war so einfach gehalten, daß Geschwindigkeitsausdrücke analytisch angegeben und mit einem Tischcomputer berechnet werden konnten. Dieses Modell (Abb. 3.7.) enthält 3 Funktionszustände der Synthetase: C_1 steht für das freie Enzym oder den in der Präinkubation vorgebildeten Enzym-Substrat-Komplex; C_2 stellt die vollständig mit Substraten komplexierte und reaktive Synthetase dar; C_3 beschreibt den Komplex aus Synthetase und Produkten ummittelbar nach der Bildung von Seryl-tRNA^{Ser}. Die Geschwindigkeitskonstante k_1 repräsentiert den mit der Substratbindung korrelierten Prozeß, k_2 steht für den geschwindigkeitslimitierenden Schritt in der produktiven Reaktion. Das Modell geht davon aus, daß die Synthetase spätestens im Komplex C_3 die Fließgleichgewichts-Bedingungen erreicht hat, so daß sich an die zwei Schritte der Anlaufphase die Reaktion im quasi-stationären Zustand (k_s) anschließt. Aus den Differentialgleichungen, die dieses Modell beschreiben, kann ein Ausdruck für die zeitabhängige Produktkonzentration berechnet werden (s. Methoden). Verwendet man diesen Ausdruck für eine Kurvenanpassung (z.B. Abb. 3.6.), so erhält man optimierte Werte für die Geschwindigkeitskonstanten k_1, k_2 und k_s. Da k_1 und k_2 symmetrisch in den einzelnen Termen des Ausdrucks auftreten, lassen sich die entsprechenden Zahlenwerte nur über zusätz-

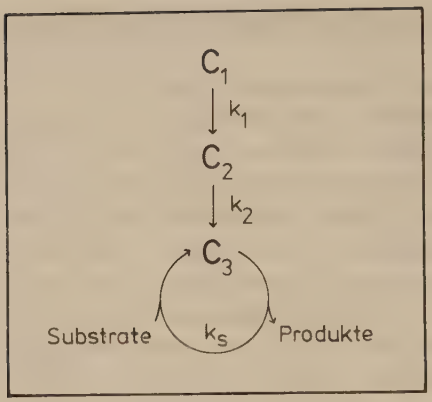


Abb. 3.7.: Reaktionsmodell für die quantitative Auswertung der Zeitkurven mit Induktionsphase.

liche Kriterien den jeweiligen Reaktionen zuordnen.

Die Anpassungen ergaben folgendes Bild (Tab. 3.1.): Die Werte für k_1 und k_2 unterscheiden sich in ihrer Abhängigkeit von der Präinkubation der Synthetase mit Substraten, was ihre eindeutige Zuordnung ermöglicht. Die Präinkubations-abhängigen Werte von k_1 steigen von 12 s^{-1} für das freie Enzym bis zu 45 s^{-1} für den Synthetase-ATP-Komplex. Unabhängig von der Art der Präinkubation besitzt k_2 in allen Anpassungen einen Wert von ca. 1,2 s^{-1}. Offensichtlich folgen auf die Substratbindung langsame Reaktionen, die nicht von den Präinkubations-Bedingungen beeinflußt werden. Da der Wert von k_2 nur wenig größer als die Wechselzahl der Synthetase (1,1 s^{-1}) ist, muß sich unter diesen Reaktionen auch der geschwindigkeitslimitierende Schritt der Synthese von Seryl-$tRNA^{Ser}$ befinden.

Tab. 3.1.: Geschwindigkeitskonstanten der langsamen Prozeße in der Anlaufphase der Aminoacylierung.

Präinkubationsmischung (C_1)	Amplitude (%)	k_1 (s^{-1})	k_2 (s^{-1})	k_s (s^{-1})
SRS	98 ± 5	12 ± 2	1,2 ± o,15	1,o5 ± o,15
SRS, Serin	97 ± 4	16 ± 2	1,17 ± o,1	1,o3 ± o,1
SRS, $tRNA^{Ser}$	96 ± 4	17 ± 2	1,17 ± o,1	o,96 ± o,15
SRS,Serin,$tRNA^{Ser}$	98 ± 2	17 ± 1	1,19 ± o,o5	o,98 ± o,15
SRS, ATP, $tRNA^{Ser}$	95 ± 5	3o ± 4	1,17 ± o,15	o,96 ± o,1
SRS, ATP	94 ± 5	45 ± 5	1,2 ± o,15	o,96 ± o,15
SRS *)	23 ± 2	12 ± 2	1,18 ± o,1	o,18 ± o,o4

Experimentelle Bedingungen wie unter Abb. 3.6. angegeben, mit Ausnahme von (*), wo abweichend 25o µM ATP und 1,5 mM $MgCl_2$ verwendet wurden. Die Amplitude der Bildung von Seryl-$tRNA^{Ser}$ ist in Prozent der Synthetase-Konzentration (19) angegeben. Zur Definition von C_1, k_1, k_2 und k_s siehe Text und Abb. 3.7. Die aufgeführten Daten sind Mittelwerte der quantitativen Auswertung von mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Sind die mit der Geschwindigkeitskonstanten k_1 beschriebenen Prozesse reguläre Bestandteile des Reaktionsmechanismus der Synthetase oder sind diese Reaktionsschritte spezifisch für die Anlaufphase der Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$? Aus der Differenz zwischen k_2 (1,2 s^{-1}) und der Wechselzahl (1,1 s^{-1}) läßt sich die Vermutung ableiten, daß kinetisch gesehen alle

Präinkubations-abhängigen Schritte auch im Reaktionszyklus unter Fließgleichgewichts-Bedingungen vorkommen können. Was ist das reaktionsmechanistische Äquivalent dieser Schritte? Für reine Assoziationsschritte sind sie zu langsam: In relaxationskinetischen Untersuchungen wurde für die Bindung der $tRNA^{Ser}$ an SRS eine Geschwindigkeitskonstante von 1 x 10^8 $M^{-1}s^{-1}$ gefunden, die für eine diffusionskontrollierte Rekombination der beiden Makromoleküle spricht (10). In der gleichen Arbeit wurde jedoch gezeigt, daß der schnellen Assoziation der $tRNA^{Ser}$ eine Umlagerung des Synthetase-$tRNA^{Ser}$-Komplexes mit einer Geschwindigkeitskonstante von 50 s^{-1} folgt. Einen vergleichbaren Wert (45 s^{-1}) hat k_1 nach Präinkubation der Synthetase mit ATP, d.h. wenn Serin und $tRNA^{Ser}$ noch an die Synthetase binden müssen. Möglicherweise beschreibt also k_1 monomolekulare Umlagerungen verschiedener Enzym-Substrat-Komplexe. Für diese Annahme spricht auch, daß in quenched-flow-Experimenten bei niedriger ATP-Konzentration unverändert k_1 = 12 s^{-1} für die freie Synthetase gefunden wurde (Tab. 3.1.), die Konstante also nicht von der ATP-Konzentration abhängt. Geht man davon aus, daß die Präinkubations-abhängigen Prozesse auch im quasi-stationären Zustand ablaufen, so lassen sich zwei weitere Aussagen über den Reaktionsmechanismus der Synthetase treffen. k_1 zeigt nach Präinkubation des Enzyms mit ATP und $tRNA^{Ser}$ einen Wert von 30 s^{-1} gegenüber 45 s^{-1} nach Präinkubation mit ATP allein. Offenbar ist die Assoziationssequenz ATP-$tRNA^{Ser}$-Serin im Reaktionsmechanismus nicht erlaubt und die tRNA muß wieder abdissoziieren, ehe Serin binden kann. Andererseits führt die Präinkubation der Synthetase mit Serin, $tRNA^{Ser}$ oder beiden Substraten zusammen immer zu einem Wert von 16 - 17 s^{-1}, der wohl im wesentlichen die Geschwindigkeit des mit der ATP-Bindung verknüpften langsamen Prozesses angibt. Daher ist möglicherweise die Reihenfolge der Assoziationen von

Serin und $tRNA^{Ser}$ nicht determiniert, solange ATP nicht gebunden ist.

3.2.3. Serin-Aktivierung

Wie die quantitative Auswertung der Zeitkurven gezeigt hat, gibt es auch nach der Substratbindung langsame Schritte im Reaktionsmechanismus von SRS. Um diese Prozesse lokalisieren zu können, wurden Teilschritte der produktiven Reaktion unter Aminoacylierungs-Bedingungen gesondert untersucht. Für die kinetische Analyse der Aktivierungsreaktion wurden verschiedene experimentelle Techniken verwendet.

Eine untere Grenze der Geschwindigkeit der Serin-Aktivierung wurde in PP_i-ATP-Austauschexperimenten unter Verwendung von $[^{32}P]$-PP_i ermittelt. Bei Substratkonzentrationen, wie sie in den quenched-flow-Experimenten (z.B. Abb. 3.5.) verwendet worden waren, und einer PP_i-Konzentration von 2 mM wurde bei optimaler Mg^{2+}-Konzentration eine Austauschgeschwindigkeit von ca. o,7 s^{-1} in Gegenwart und ca. 4 s^{-1} in Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$ gemessen (Abb. 3.8.). Diese Ergebnisse zeigen, daß die Aktivierung von Serin möglicherweise ein langsamer Schritt in Reaktionsmechanismus der SRS ist. Da der PP_i-ATP-Austausch in Gegenwart von $tRNA^{Ser}$ noch langsamer als die Aminoacylierung ist, gibt es offenbar auch einen oder mehrere langsame Prozesse in der Rückreaktion, der Bildung von ATP. Optimale Austauschgeschwindigkeiten benötigen höhere Mg^{2+}-Konzentrationen als die Aminoacylierung (Abb. 3.8.). Dieser Befund deutet darauf hin, daß $MgPP_i$ das aktive Substrat des Austauschs ist.

Eine qualitative Abschätzung der oberen Grenze der Aktivierungsgeschwindigkeit ergab sich aus Experimenten, in denen

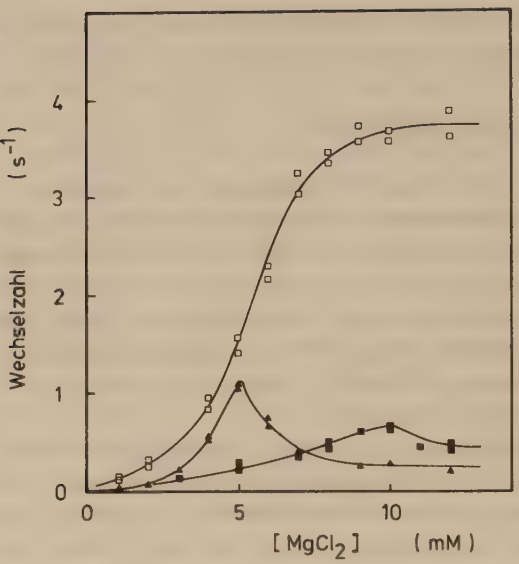


Abb. 3.8.: Vergleich der Wechselzahlen der Synthetase für die Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$ (▲), den PP_i-ATP-Austausch in Abwesenheit (□) und in Gegenwart von $tRNA^{Ser}$ (■) bei verschiedenen $MgCl_2$-Konzentrationen. Substrat-Konzentrationen im Aminoacylierungstest: ATP 5 mM, [^{14}C]-Serin o,5 mM, $tRNA^{Ser}$ 2o µM. Substrat-Konzentrationen im Austausch-Experiment: ATP 5 mM, Serin o,5 mM, [^{32}P]-PP_i 2 mM, $tRNA^{Ser}$ (nur in ■) 2o µM.

die Kinetik der ATP-Hydrolyse unter Aminoacylierungs-Bedingungen gemessen wurde (Abb. 3.9.). Die Messungen mit Reakti-

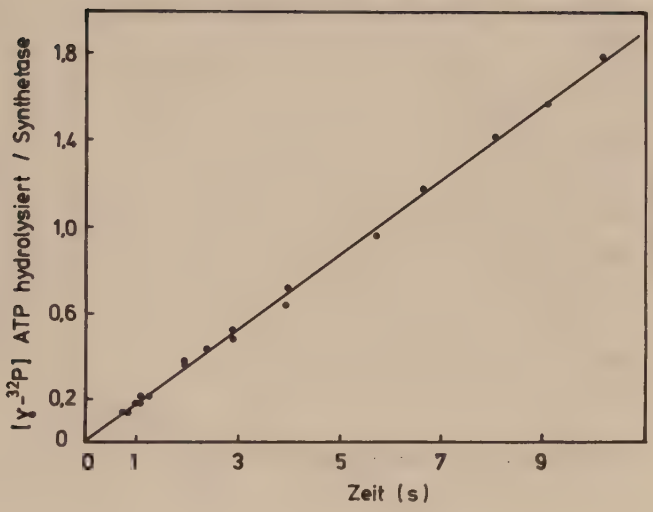


Abb. 3.9.: Kinetik der ATP-Hydrolyse unter Aminoacylierungsbedingungen. Konzentrationen im Reaktionsgemisch: SRS 3 µM, $tRNA^{Ser}$ 21 µM, Serin o,5 mM, [γ-^{32}P]-ATP o,15 mM und $MgCl_2$ 1,5 mM. Das Mischen der Synthetase mit den Substraten und das Stoppen der Reaktion mit 5%iger Perchlorsäure erfolgte von Hand. Experimentelle Einzelheiten der Messungen siehe Methoden.

onszeiten im Sekundenbereich zeigen zwar nur den Zeitverlauf der ATP-Hydrolyse im quasi-stationären Zustand der Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$, lassen jedoch auch Rückschlüsse auf die Anlaufphase der Zeitkurve zu. Aus dem Fehlen eines anfänglichen raschen Anstiegs (burst) der PP_i-Freisetzung kann man

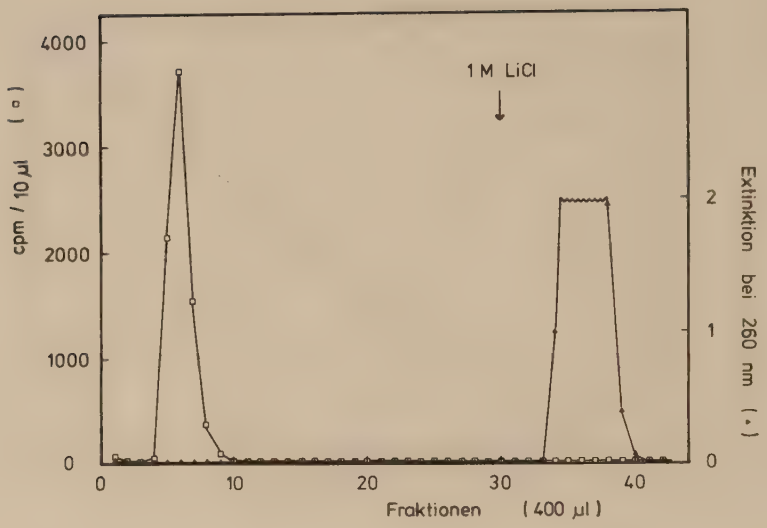


Abb. 3.1o.: Auftrennung eines AMP/ATP-Gemisches durch Säulenchromatographie an PEI-Cellulose. Säulenvolumen 2 ml. Ein Gemisch aus [^{14}C]-AMP (29o.ooo cpm) und [^{12}C]-ATP (5 µMol) in 1 M HCOOH wurde auf die Säule aufgezogen und mit der gleichen Säurekonzentration eluiert, nach 3o Fraktionen à o,4 ml wurde die Elution mit 1 M LiCl in 1 M HCOOH fortgesetzt. Temperatur 4° C.

schließen, daß die Aktivierung von Serin nicht wesentlich schneller als die Aminoacylierung von tRNA^{Ser} erfolgt.

Um die Geschwindigkeit quantitativ bestimmen zu können, wurde die Aktivierung unter Aminoacylierungsbedingungen mit

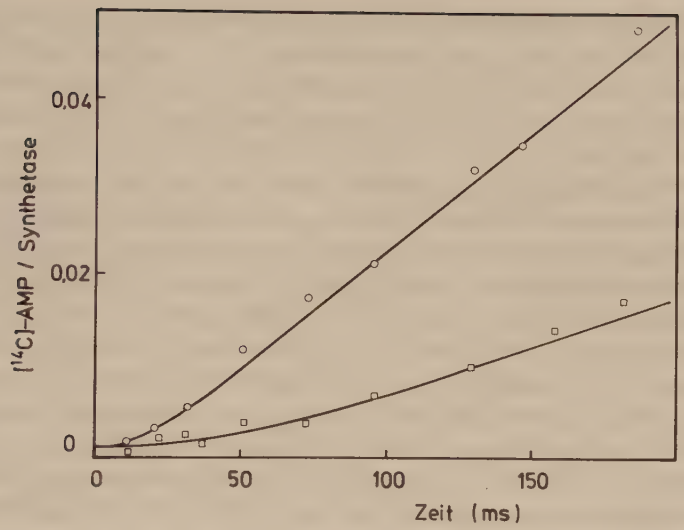


Abb. 3.11.: Kinetik der ATP-Hydrolyse während der Anlaufphase der Aminoacylierung. (□): SRS (1o µM) wurde im quenched-flow-Apparat mit $tRNA^{Ser}$ (5o µM), Serin (1 mM), [^{14}C]-ATP (o,3 mM) und $MgCl_2$ (2 mM) gemischt. (○): SRS (12 µM) wurde mit [^{14}C]-ATP (o,3 mM) und $MgCl_2$ (1,3 mM) präinkubiert und dann im quenched-flow-Apparat mit $tRNA^{Ser}$ (5o µM), Serin (1 mM), [^{14}C]-ATP (o,3 mM) und $MgCl_2$ (1,3 mM) gemischt. Zum Stoppen der Reaktion wurde 1 M HCOOH verwendet. Die Bestimmung der AMP- bzw. Seryl-AMP-Konzentration nach den angegebenen Reaktionszeiten erfolgte über Säulenchromatographie an PEI-Cellulose (siehe Abb. 3.1o.).

Hilfe der quenched-flow-Technik untersucht. Da hierzu radioaktives ATP mit hoher spezifischer Aktivität und in relativ hohen Konzentrationen eingesetzt werden sollte, wurde für diese Versuche [^{14}C]-ATP verwendet, das leichter nachgereinigt werden konnte und niedrigere Blindwerte ergab. Die Produktkonzentration wurde über Säulenchromatographie an PEI-Cellulose analysiert, die Elutionsbedingungen entsprachen einem publizierten Dünnschicht-Verfahren (63). Die erzielte Auftrennung von AMP und ATP war gut, AMP konnte quantitativ von der Säule eluiert werden (Abb. 3.1o.). Ser-AMP wurde unter den gewählten Bedingungen zusammen mit AMP eluiert. Die quenched-flow-Experimente zeigten, daß auch in der Anlaufphase der Aktivierung eine Induktionsphase auftritt (Abb. 3.11.). Bei Verwendung der Geschwindigkeitskonstanten von Tab. 3.1. und einer Reaktionsamplitude entsprechend der Konzentration und dem K_M-Wert von ATP wiesen die berechneten Zeitkurven nur geringfügige Abweichungen von den Meßpunkten auf. Mit $k_2 = 1,2\ s^{-1}$ (3.2.2.) ist daher im wesentlichen die Aktivierung von Serin beschrieben, die somit zugleich als der geschwindigkeitsbegrenzende Schritt der Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$ identifiziert ist.

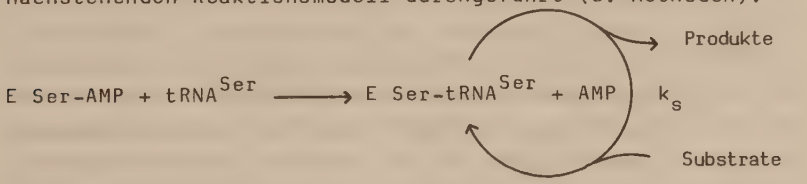
3.2.4. Transfer des aktivierten Serins auf $tRNA^{Ser}$

Um Aufschluß über die Geschwindigkeit des Transfer-Schrittes zu erhalten, wurde nach Präinkubation der Synthetase mit ATP und Serin die Aminoacylierung im quenched-flow-Apparat durch Zugabe von $tRNA^{Ser}$ gestartet und die Zeitkurve der Bildung von Seryl-$tRNA^{Ser}$ bestimmt. Innerhalb der ersten 1oo ms wurden ca. o,45 Mol Seryl-$tRNA^{Ser}$ pro Mol SRS rasch synthetisiert, dann ging die Geschwindigkeit der Aminoacylierung zurück auf den Wert im Fließgleichgewicht (Abb. 3.12.). Der

rasche Anstieg (burst) der Konzentration an Seryl-$tRNA^{Ser}$ während der Anlaufphase der Aminoacylierung zeigt an, daß die Synthese beladener $tRNA^{Ser}$ ausgehend vom aktivierten Komplex wesentlich schneller abläuft als die Gesamtreaktion.

Wurde für die Präinkubation der Synthetase radioaktives Serin verwendet, zusammen mit der $tRNA^{Ser}$ jedoch ein Überschuß an unmarkiertem Serin zugesetzt, so zeigte die Zeitkurve der Aminoacylierung unverändert einen anfänglich raschen Anstieg der Konzentration an Seryl-$tRNA^{Ser}$ (Abb. 3.12.). Aufgrund der herabgesetzten spezifischen Aktivität des Serins wurde jedoch der weitere Zeitverlauf der Aminoacylierung nicht beobachtet. Wurde dagegen unmarkiertes Serin für die Präinkubation verwendet und radioaktives Serin erst mit der $tRNA^{Ser}$ zugegeben, so wurde eine extrem lange Induktionsphase gemessen (Abb. 3.12.). Offensichtlich wird in der Anlaufphase der Reaktion nur solches Serin rasch auf $tRNA^{Ser}$ transferiert, das zuvor in der Präinkubation mit SRS und ATP aktiviert werden konnte. Ein Austausch des aktivierten Serins mit dem im quenched-flow-Apparat zusammen mit der $tRNA^{Ser}$ zugegebenen Serin findet während der Transfer-Reaktion nicht statt.

Die quantitative Auswertung der Zeitkurven wurde mit dem nachstehenden Reaktionsmodell durchgeführt (s. Methoden):



Die Kurvenanpassung ergab für die Geschwindigkeitskonstante des Transfers (k_{Tr}) einen Wert von ca. 35 s^{-1} (Tab. 3.2.).

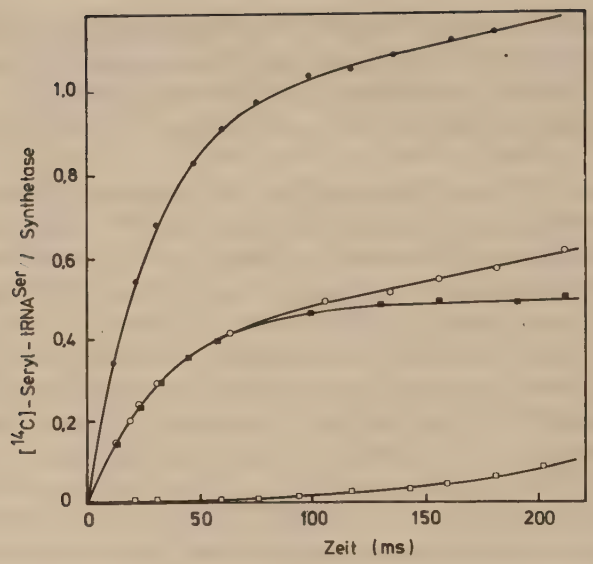


Abb. 3.12.: Zeitkurven der Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$ nach vorausgegangener Aktivierung der Aminosäure. SRS (6 µM) wurde mit ATP (5 mM), $MgCl_2$ (5 mM) und [^{14}C]-Serin (o,5 mM) präinkubiert und dann im quenched-flow-Apparat mit einer Lösung von $tRNA^{Ser}$ (42 µM), ATP (5 mM), $MgCl_2$ (5 mM) und [^{14}C]-Serin (o,5 mM) gemischt (○). Das gleiche Experiment wurde in Anwesenheit von Pyrophosphatase (3 U/ml) wiederholt (●). Bei zwei weiteren Experimenten erfolgte einmal die Präinkubation der SRS mit [^{14}C]-Serin (o,5 mM), während unmarkiertes Serin (5o mM) im quenched-flow-Apparat zugegeben wurde (■), das andere Mal wurde die Synthetase mit unmarkiertem Serin (o,5 mM) präinkubiert und [^{14}C]-Serin (o,5 mM) im quenched-flow-Apparat zugegeben (□). Sonstige Konzentrationen wie in (○).

Tab. 3.2.: Geschwindigkeitskonstante des Transfers von präaktiviertem Serin auf $tRNA^{Ser}$ während der Anlaufphase der Aminoacylierung.

Transfer-Experiment		Amplitude (%)	k_{Tr} (s^{-1})	k_s (s^{-1})	Amplitude x k_s (s^{-1})
ohne Zusatz	(○)	45 ± 4	35 ± 3	2,4 ± o,2	1,o5 ± o,15
"chase"-Exp.	(■)	46 ± 3	32 ± 3	---	---
+ PPase	(●)	9o ± 6	36 ± 1	1,2 ± o,1	1,o4 ± o,15
+ PP_i		9 ± 5	35 ± 3	8,7 ± o,5	o,8 ± o,3

Enzym- und Substratkonzentrationen wie unter Abb. 3.12. (die Symbole verweisen auf die entsprechenden Zeitkurven), mit Ausnahme des letzten Experiments, wo 2oo µM PP_i vor der Präinkubation zugesetzt worden war. Die Amplitude der Bildung von Seryl-$tRNA^{Ser}$ ist in Prozent der Synthetase-Konzentration angegeben. Zur Definition von k_{Tr} und k_s siehe Text, Amplitude x k_s gibt die Geschwindigkeit der Aminoacylierung im quasi-stationären Zustand. Die aufgeführten Daten sind Mittelwerte der quantitiven Auswertung von mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Wurde die Präinkubation der Synthetase mit ATP und Serin in Gegenwart von Pyrophospatase durchgeführt, so stieg die Stöchiometrie des anfangs schnell transferierten Serins von ca. o.45 auf etwa o.9 Mol pro Mol SRS, die Geschwindigkeitskonstante des Transfers blieb jedoch gleich (Abb. 3.12., Tab. 3.2.). Umgekehrt nahm bei Präinkubation in Gegenwart von PP_i die Menge an rasch transferiertem Serin ab

(Tab. 3.2.). Auch hier blieb der Wert von k_{Tr} konstant, die Geschwindigkeit der Aminoacylierung im quasi-stationären Zustand war bei der eingesetzten PP_i-Konzentration nur geringfügig verlangsamt (Tab. 3.2.). PP_i hatte keinen Einfluß auf die Amplitude des Transfers, wenn es erst nach der Präinkubation zusammen mit der $tRNA^{Ser}$ zugesetzt wurde. Offensichtlich hemmt PP_i bei Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$ schon in niedrigen Konzentrationen die Aktivierung von Serin. Wird PP_i durch die Pyrophosphatase abgebaut, so kann 1 Serin pro Synthetase-Dimer auf $tRNA^{Ser}$ transferiert werden.

Der Zahlenwert der Geschwindigkeitskonstante des Transfers (35 s^{-1}) ist vergleichbar mit dem der Geschwindigkeitskonstante k_1 bei Präinkubation der Synthetase mit ATP (45 s^{-1}). Auch die in (1o) angegebene Geschwindigkeitskonstante für die der Assoziation von $tRNA^{Ser}$ folgende langsame Umlagerung des SRS-$tRNA^{Ser}$-Komplexes (5o s^{-1}) besitzt dieselbe Größenordnung. Offensichtlich ist diese Umlagerung, bedingt durch die experimentelle Anordnung, auch der geschwindigkeitsbegrenzende Schritt in der Transfer-Reaktion.

3.2.5. Dissoziation von Seryl-$tRNA^{Ser}$

Wurde die Synthetase mit ATP, Serin und zusätzlich einer äquivalenten Menge $tRNA^{Ser}$ inkubiert und dann im quenched-flow-Gerät mit einem Überschuß an $tRNA^{Ser}$ gemischt, so trat in der Zeitkurve der Aminoacylierung vor dem raschen Anstieg der Konzentration an Seryl-$tRNA^{Ser}$ eine kurze Induktionsphase von wenigen ms Dauer auf (Abb. 3.13.). Da in Gegenwart von PP_i lediglich die Amplitude der Transferreaktion verringert war (Tab. 3.2.) und in Gegenwart von AMP bis zu einer Konzentration von 1 mM überhaupt keine Änderung der Transfer-Kinetik beobachtet wurde, kann für das Auftreten der In-

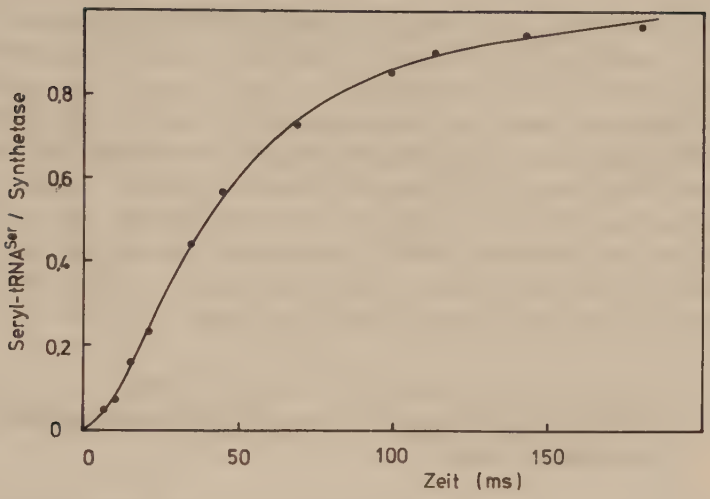


Abb. 3.13.: Kinetik der Transfer-Reaktion in Gegenwart von Seryl-tRNA^{Ser}. SRS (6 µM) wurde mit ATP (5 mM), $MgCl_2$ (5 mM), [^{14}C]-Serin (o,5 mM), tRNA^{Ser} (6 µM) und Pyrophosphatase (3 u/ml) inkubiert und im quenched-flow-Apparat mit einer Lösung von 42 µM tRNA^{Ser}, 5 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$ und o,5 mM [^{14}C]-Serin gemischt. Die Radioaktivität der [^{14}C]-Seryl-tRNA^{Ser} aus der Präinkubationsmischung ist in der Abbildung als Blindwert abgezogen.

duktionsphase allein die in der Präinkubation gebildete Seryl-tRNA^{Ser} verantwortlich sein. Die quantitative Auswertung der Meßergebnisse auf der Grundlage des 2-Schritt-Mo-

dells von Abb. 3.7. ergab Geschwindigkeitskonstanten von 7o s^{-1} und 35 s^{-1}. Offenbar bleibt die in der Präinkubationsphase aminoacylierte $tRNA^{Ser}$ an die Synthetase gebunden und wird erst durch die Assoziation der nächsten unbeladenen $tRNA^{Ser}$ verdrängt. Die Geschwindigkeitskonstante von 7o s^{-1} steht dann für die Dissoziation der Seryl-$tRNA^{Ser}$ unter dem Einfluß von $tRNA^{Ser}$. Serin kann offensichtlich auch in Gegenwart von beladener $tRNA^{Ser}$ aktiviert werden, so daß der Transfer mit der normalen Geschwindigkeit von 35 s^{-1} abläuft, nachdem die Seryl-$tRNA^{Ser}$ das Enzym verlassen hat.

3.3. Einfluß der Salzkonzentration auf die Geschwindigkeit der Aminoacylierung

Der Standardpuffer, der für die kinetischen Experimente mit SRS verwendet wurde, besaß nur eine geringe Ionenstärke. Der Einfluß der Salzkonzentration auf die Kinetik der Aminoacylierung sowohl in der Anlaufphase der Reaktion wie im Fließgleichgewicht konnte daher gesondert untersucht werden.

Die Anlaufphase der Aminoacylierung, ausgehend von der freien Synthetase, wies bei Zusatz von KCl eine deutlich kürzere Induktionsphase auf (Abb. 3.14.). Die quantitative Auswertung der Zeitkurve ergab für die Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 Werte von 15 s^{-1} und 1,9 s^{-1} gegenüber 12 s^{-1} und 1,2 s^{-1} im Experiment ohne Salzzusatz. Die Geschwindigkeitskonstante des Transferschrittes war unter den gleichen Bedingungen mit 39 statt 35 s^{-1} nur geringfügig verändert (Abb. 3.15.). Die Salzkonzentration beeinflußt also vor allem die Geschwindigkeit der Aktivierungsreaktion.

Die Geschwindigkeit der Aminoacylierung im Fließgleichge-

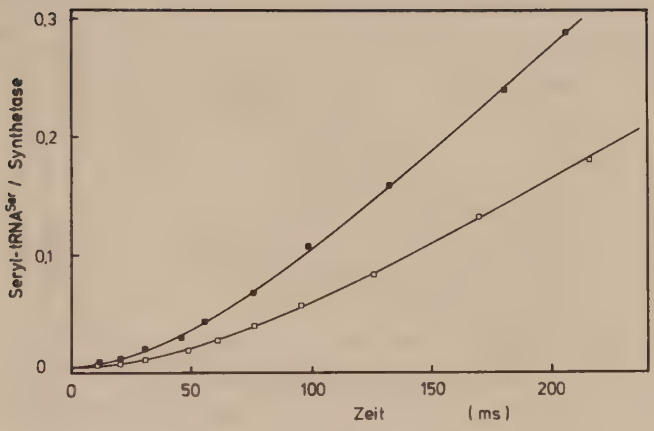


Abb. 3.14.: Einfluß der KCl-Konzentration auf die Kinetik der Aminoacylierung während der Anlaufphase der Reaktion. SRS (6 µM) wurde im quenched-flow-Apparat mit tRNA^{Ser} (42 µM), [^{14}C]-Serin (1 mM), ATP (1o mM) und $MgCl_2$ (1o mM) gemischt (□). Im zweiten Experiment enthielten die Lösungen zusätzlich 15o mM KCl und 2 mM $MgCl_2$ (■).

wicht stieg von ca. 1,1 s^{-1} bei Reaktion ohne Salzzusatz auf etwa 4,5 s^{-1} in Gegenwart von o,6 M KCl (Abb. 3.16.). Bei höheren Salzkonzentrationen nahm die Aminoacylierungsgeschwindigkeit wieder ab, jedoch wurde selbst in Gegenwart von 2 M KCl noch eine Geschwindigkeit gemessen, welche der der Reaktion in Abwesenheit von KCl entspricht. Die Experimente zeigten im Einklang mit früheren Ergebnissen (19) eine komplexe Mg^{2+}-Abhängigkeit der Aminoacylierung, optimale Geschwindigkeiten ließen sich nur in einem engen Bereich der

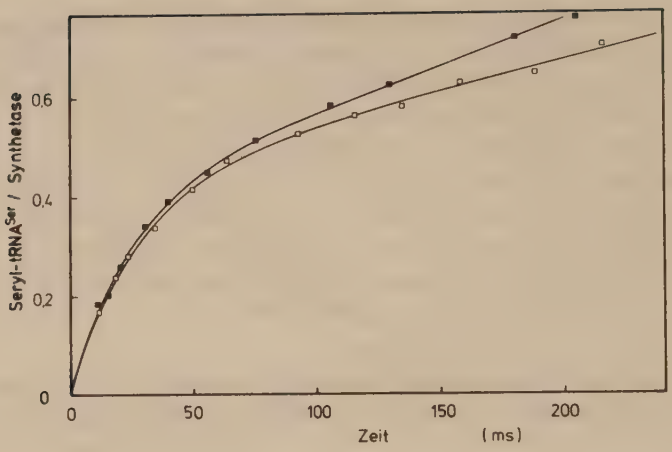


Abb. 3.15: Einfluß der KCl-Konzentration auf die Kinetik des Transfers von aktiviertem Serin auf $tRNA^{Ser}$ während der Anlaufphase der Aminoacylierung. SRS (6 µM) wurde mit ATP (5 mM), $MgCl_2$ (5 mM) und [^{14}C]-Serin (o,5 mM) präinkubiert und dann im quenched-flow-Apparat mit $tRNA^{Ser}$ (42 µM), [^{14}C]-Serin (o,5 mM), ATP (5 mM) und $MgCl_2$ (5 mM) gemischt (□). Das Experiment wurde unter Zusatz von 15o mM KCl und 2 mM $MgCl_2$ wiederholt (■).

Mg^{2+}-Konzentration erzielen. Mit steigender Salzkonzentration verlagerte sich auch das Optimum der Aminoacylierungsgeschwindigkeit zu immer höheren Mg^{2+}-Konzentrationen (Abb. 3.16.). Zwei gegenläufige Effekte sind also mit der Erhöhung der Ionenstärke verknüpft. Zum einen wird die Geschwindigkeit der Aminoacylierung durch die Beschleunigung der ge-

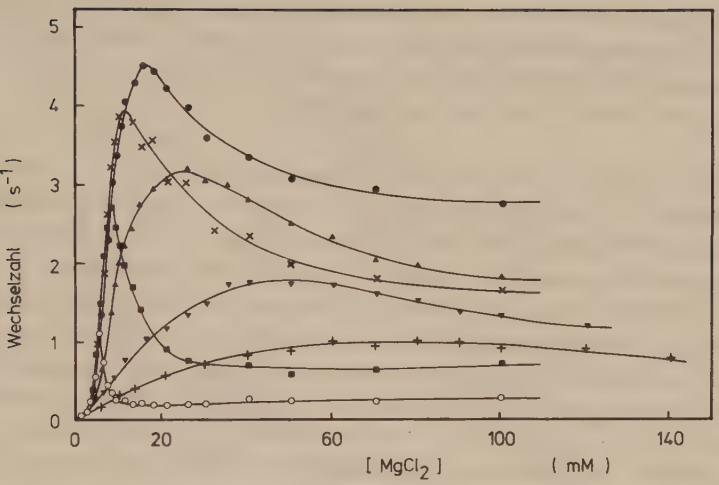


Abb. 3.16.: Einfluß der Konzentration von KCl und $MgCl_2$ auf die Geschwindigkeit der Aminoacylierung im quasi-stationären Zustand. Substrat-Konzentrationen im Test: 5 mM ATP, o,5 mM [^{14}C] -Serin, 2o µM $tRNA^{Ser}$. KCl-Konzentrationen im Test: (○) ohne KCl, (■) o,2 M, (×) o,45 M, (●) o,6 M, (▲) o,9 M, (▼) 1,2 M, (+) 2,o M KCl.

schwindigkeitsbegrenzenden Aktivierungsreaktion gesteigert. Andererseits werden offensichtlich auch Mg^{2+}-Ionen durch die Kationen des Salzes aus katalytisch wichtigen Bindungen zu Synthetase, tRNA oder ATP verdrängt, was wiederum zu einer Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit führt. Gleicht man diese Kompetition durch eine entsprechende Erhöhung der

$MgCl_2$-Konzentrationen aus, so erreicht die Aminoacylierungsgeschwindigkeit der SRS Werte, die über das früher bei konstanter Mg^{2+}-Konzentration gemessene Maximum von etwa 2 s^{-1} bei 2oo mM KCl (1o, 19) hinausgehen.

Weitere Experimente, in denen verschiedene Salze in jeweils gleicher Konzentration eingesetzt wurden, ergaben Hinweise auf unterschiedliche Einflüsse der Salzanionen auf die Aminoacylierungsreaktion (Abb. 3.17.). In Gegenwart einer Reihe von Salzen, darunter auch KCl, zeigte die Mg^{2+}-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit einen ähnlichen Verlauf wie bei der Aminoacylierung ohne Zusatz von Salz, nur geringfügig höhere $MgCl_2$-Konzentrationen waren notwendig, um die maximale Geschwindigkeit der Aminoacylierung zu erreichen. Bei gleicher Konzentration stimulierten diese Salze die Aktivität der Synthetase in unterschiedlichem Ausmaß: Die Reaktionsgeschwindigkeit bei optimaler $MgCl_2$-Konzentration nahm in der Reihenfolge KOAc < KCl < KBr < KJ < KNO_3 zu. In der gleichen Reihenfolge steigt auch die chaotrope Wirkung der Anionen (64, 65). In Gegenwart von Thiocyanat- oder Sulfat-Ionen, die in der Reihe der chaotropen Anionen völlig entgegengesetzte Positionen einnehmen, zeigte sich dagegen eine ganz andere Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der $MgCl_2$-Konzentration (Abb. 3.17.). Bei Zusatz der entsprechenden Salze mußten deutlich höhere $MgCl_2$-Konzentrationen eingesetzt werden, um maximale Aminoacylierungsgeschwindigkeiten zu erreichen, außerdem trat der rasche Abfall der Reaktionsgeschwindigkeit nach Überschreiten der optimalen $MgCl_2$-Konzentration nicht mehr auf. Offenbar bewirkt die Anwesenheit von SCN^-- oder SO_4^{2-}-Ionen merkliche Veränderungen im Mechanismus der Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$. Unabhängig von diesen speziellen Anionen-Effekten führte die Zugabe von Salz generell zu einer wesentlichen Steigerung

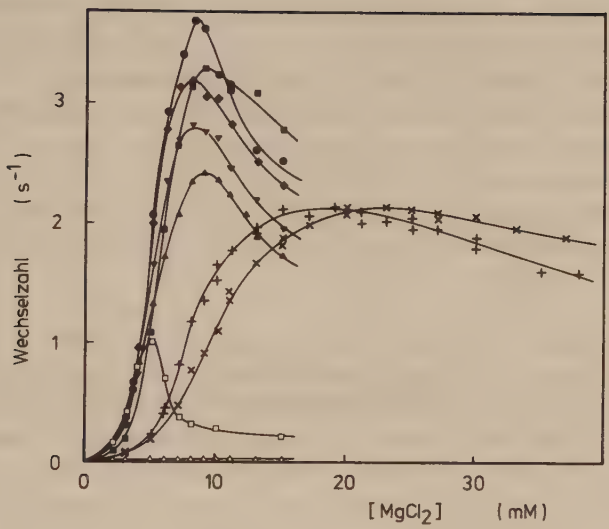


Abb. 3.17.: Abhängigkeit der Aminoacylierungsgeschwindigkeit von der $MgCl_2$-Konzentration bei Zusatz von Salzen mit verschiedenen Anionen: (□) ohne Salz, (▲) KOAc, (▼) KCl, (◆) KBr, (■) KJ, (●) KNO_3, (+) KSCN, (x) $(NH_4)_2SO_4$, (△) KF. Salzkonzentration jeweils 2oo mM. Substratkonzentrationen im Aminoacylierungstest: ATP 5 mM, [^{14}C]-Serin o,5 mM, $tRNA^{Ser}$ 2o µM.

der Aminoacylierungsgeschwindigkeit. Lediglich bei Zusatz von KF wurde eine Ausnahme von dieser Regel beobachtet. Die Anwesenheit der F^--Ionen verursachte eine vollständige Hemmung der Synthetase-Aktivität im untersuchten $MgCl_2$-Konzentrationsbereich, was wohl auf die geringe Löslichkeit von

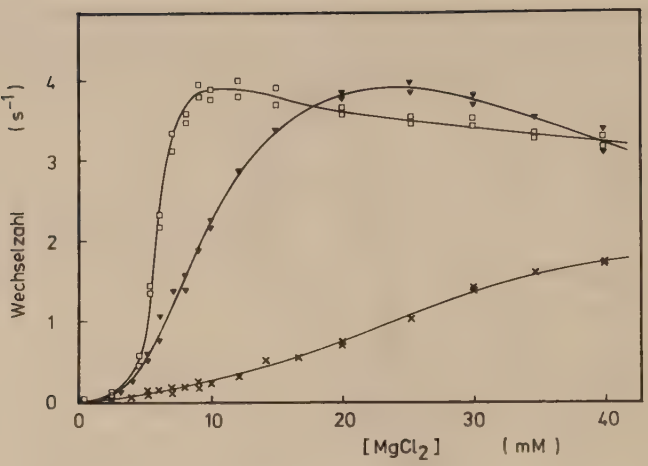


Abb. 3.18.: Abhängigkeit der Geschwindigkeit des PP_i-ATP-Austauschs von der $MgCl_2$-Konzentration bei Zusatz verschiedener Salze: (□) ohne Salz, (▼) 2oo mM KCl, (×) 2oo mM $(NH_4)_2SO_4$. Substratkonzentrationen im Austausch-Experiment: ATP 5 mM, $[^{32}P]$-PP_i 2 mM, Serin o,5 mM.

MgF_2 und die dadurch bedingte Reduzierung der Mg^{2+}-Konzentration zurückzuführen ist.

Ihre unterschiedlichen Einflüsse auf die Mg^{2+}-Abhängigkeit der Synthetase-Aktivität zeigten KCl und $(NH_4)_2SO_4$ stellvertretend für die jeweilige Anionen-Gruppe auch im PP_i-ATP-Austauschexperiment in Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$ (Abb. 3.18.). Aus dem Befund, daß diese Anionen-spezifischen Effekte auch

bei der Reaktion der SRS mit Serin und ATP allein auftreten, kann man schließen, daß hierfür Wechselwirkungen mit der $tRNA^{Ser}$ nicht verantwortlich sind. Die $tRNA^{Ser}$ scheint dagegen in den Mechanismus der generellen salzabhängigen Stimulierung der Aminoacylierung involviert zu sein. Diese Annahme ergibt sich aus der Tatsache, daß im PP_i-ATP-Austausch in Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$ bei Erhöhung der Ionenstärke keine Steigerung der Synthetase-Aktivität beobachtet wurde (Abb. 3.18.).

Faßt man alle Ergebnisse zusammen, so bietet sich eine mechanistische Interpretation des Ionenstärke-Einflusses auf die Aminoacylierungsgeschwindigkeit an. Die Salzkonzentration beeinflußt offensichtlich nicht die Geschwindigkeit der Aktivierungsreaktion in Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$ (Abb. 3.18.). Es ist jedoch bekannt, daß mit steigender Salzkonzentration die Geschwindigkeit der Dissoziation des SRS-$tRNA^{Ser}$-Komplexes zunimmt (1o). In Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$ aber läuft die Aktivierung von Serin, der geschwindigkeitslimitierende Schritt der Aminoacylierung, schneller ab als in Gegenwart von $tRNA^{Ser}$ (Abb. 3.8.). Die Zunahme der Aminoacylierungsgeschwindigkeit bei Erhöhung der Salzkonzentration (Abb. 3.14, 3.16) könnte also darauf zurückzuführen sein, daß infolge der Ionenstärke-Abhängigkeit des Bindungsgleichgewichts der $tRNA^{Ser}$ die Zahl der Synthetasemoleküle zunimmt, die die Aktivierungsreaktion in Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$ katalysieren können. Mit dieser Annahme stimmt auch überein, daß die maximale Aminoacylierungsgeschwindigkeit bei optimaler KCl- und $MgCl_2$-Konzentration in etwa der maximalen Geschwindigkeit des PP_i-ATP-Austauschs in Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$ entspricht. Wird die optimale Salzkonzentration überschritten, so geht die Geschwindigkeit der Aminoacylierung wieder zurück (Abb. 3.16.). Auch diese Abnahme der Aminoacylie-

rungsgeschwindigkeit läßt sich über den salzabhängigen Anstieg der Dissoziationsgeschwindigkeit der $tRNA^{Ser}$ erklären (lo).

4. AKTIVIERUNG UND TRANSFER VON SERIN: WEITERE CHARAKTERISIERUNG DER TEILREAKTIONEN

Mit Hilfe der quenched-flow-Experimente konnten zwar detaillierte Informationen über die Geschwindigkeit einer Reihe von Teilschritten im Reaktionsmechanismus der SRS gewonnen werden, wichtige Fragen blieben jedoch offen oder wurden durch die Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen erst aufgeworfen: Warum wird in den Transferexperimenten nur ca. o,5 Mol Serin pro Mol SRS rasch auf $tRNA^{Ser}$ übertragen, obwohl unter den experimentellen Bedingungen die Synthetase weitgehend mit Substraten gesättigt sein sollte? Weshalb bewirkt die Gegenwart von Pyrophosphatase einerseits und Pyrophosphat andererseits so drastische Veränderungen der Transfereffizienz, die mit der früher (21) bestimmten schwachen Hemmkonstante von Pyrophosphat bei der Aminoacylierung kaum vereinbar sind? Ist wirklich Seryl-Adenylat das aktivierte Intermediat für die Synthese der Seryl-$tRNA^{Ser}$? In den Transferversuchen findet die Aktivierung des Serins während der Präinkubationsphase in Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$ statt. Bewirkt die Gegenwart von $tRNA^{Ser}$ Änderungen im Mechanismus der Aktivierungsreaktion? Um Anhaltspunkte für Antworten auf diese Fragen zu erhalten, wurde die Aktivierung von Serin in Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$ und die Reaktion des aktivierten Komplexes mit $tRNA^{Ser}$ genauer untersucht.

4.1. Kinetische Untersuchungen und Gleichgewichtsmessungen zur Aktivierung von Serin in Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$

Bereits kurze Zeit nach der ersten Reindarstellung der SRS aus Hefe veröffentlichten G. L. Cantoni und Mitarbeiter auch Resultate aus Untersuchungen zur Charakterisierung des Komplexes aus Synthetase und aktiviertem Serin (66). Sie zeigten, daß aus einer Lösung von SRS, ATP, Mg^{2+} und Serin in Gegenwart von Pyrophosphatase über Molekularsieb-Chromatographie ein Synthetasekomplex abgetrennt werden kann, der Serin und AMP im Verhältnis 1 : 1 zur Synthetase gebunden enthält. Von diesem Komplex konnte ein Teil des Serins auf $tRNA^{Ser}$ transferiert werden. Aus der Analogie zu Befunden bei anderen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (67, 68) schlossen die Autoren, daß die aktivierte Aminosäure im Komplex als Seryl-Adenylat vorliegt. In der gleichen Arbeit wurde auch eine modifizierte Version des von M. Yarus und P. Berg (69) eingeführten Filterbindungstests beschrieben, mit deren Hilfe der aktivierte Komplex ebenfalls nachgewiesen werden konnte. Allerdings erlaubte dieser Test keine quantitativen Aussagen, da der aktivierte Komplex nur unvollständig an die Nitrocellulose-Filter gebunden wurde. Im Prinzip bietet der Filterbindungstest jedoch die Möglichkeit, schnell und einfach Gleichgewichtsmessungen der Aktivierung durchzuführen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen, durch eine Optimierung der Testbedingungen eine quantitative Bindung des aktivierten Komplexes an die Nitrocellulose-Membran zu erzielen.

4.1.1. Isolierung des aktivierten Komplexes durch Bindung an Nitrocellulose-Filter

Eine Lösung von SRS, [^{14}C]-Serin, ATP, $MgCl_2$ und Pyrophospha-

tase wurde inkubiert, bis der Gleichgewichtszustand der Aktivierung erreicht war. Dann wurden aliquote Anteile dieser Lösung mit verschiedenen Puffern versetzt und über Nitrocellulose-Filter abgesaugt. In Tab. 4.1. sind die Ausbeuten an aktiviertem Komplex unter den verschiedenen Pufferbedingungen aufgeführt. Die Ergebnisse zeigen, daß für hohe Ausbeuten eine Reduzierung der Konzentration an freien Mg^{2+}-Ionen durch Komplexierung mit EDTA ausschlaggebend ist. Aber auch in Gegenwart von GSH oder höheren Salzkonzentrationen steigt die Ausbeute an adsorbiertem Komplex. Eine der theoretischen Kalkulation zufolge nahezu quantitative Adsorption wurde mit einem Filtrationspuffer erzielt, der Tris, EDTA, GSH und KCl enthielt (Tab. 4.1.). Dieser Puffer wurde in den folgenden Filterbindungsexperimenten als Standard-Filtrationspuffer verwendet. Es ist anzunehmen, daß diese Pufferbedingungen zu einer Stabilisierung des aktivierten Komplexes beitragen. Jedenfalls blieb die Ausbeute an adsorbierter Radioaktivität über 2 Stunden konstant, als ein Reaktionsansatz analog zu den Angaben in Tab. 4.1. mit dem Standard-Filtrationspuffer verdünnt und dann bei 0° C inkubiert wurde. Bei einem parallel durchgeführten Experiment, in dem für die Verdünnung lediglich Tris-Puffer verwendet wurde, nahm dagegen die Ausbeute an Filter-gebundener Radioaktivität im gleichen Zeitraum konstant ab.

Die Effizienz der Bindung des aktivierten Komplexes an die Nitrocellulose-Membran wurde auch experimentell getestet. Dazu wurde eine Lösung von 3 µM SRS, o,5 mM [^{14}C]-Serin, 5 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$ und 3 U/ml Pyrophosphatase 15 Minuten bei 25° C inkubiert. Ein Teil der Reaktionslösung wurde auf eine Sephadex-G-25-Säule aufgetragen (s. Methoden). Die Säule wurde bei 0° C mit dem Standard-Filtrationspuffer eluiert und die Protein-haltigen Fraktionen wurden auf ihre Radioak-

Tab. 4.1.: Optimierung des Nitrocellulosefilter-Bindungstests: Einfluß verschiedener Filtrationspuffer auf die Ausbeute an Membran-gebundenem aktiviertem Komplex.

Puffer	Ausbeute
2o mM Tris, pH 7,o	5o - 7o %
2o mM Tris, 1 mM GSH, pH 7,o	55 - 8o %
*2o mM Tris, 1o mM $MgCl_2$, pH 7,o	3o - 6o %
2o mM Tris, o,5 M KCl, pH 7,o	7o - 85 %
2o mM Tris, o,5 M $(NH_4)_2SO_4$, pH 7,o	7o - 85 %
2o mM EDTA, pH 7,o	8o - 95 %
2o mM Tris, 2o mM EDTA, 1 mM GSH, pH 7,o	85 - 95 %
2o mM Tris, 2o mM EDTA, 1 mM GSH, o,5 M $(NH_4)_2SO_4$, pH 7,o	85 - 95 %
2o mM Tris, 2o mM EDTA, 1 mM GSH, o,5 M KCl, pH 7,o	9o - 95 %

loo µl einer Lösung von 3 µM SRS, o,5 mM [^{14}C]-Serin, 5 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$ und 3 U/ml Pyrophosphatase wurden 15 min bei 25° C inkubiert, danach mit 1 ml des eiskalten Filtrationspuffers versetzt und langsam über Nitrocellulose-Filter abgesaugt (s. Methoden). Die Filter wurden mit 3 x 5 ml eiskaltem Filtrationspuffer nachgespült, getrocknet und auf die gebundene Radioaktivität getestet. Die %-Angaben zur Ausbeute an gebundenem Komplex fassen die Ergebnisse von jeweils 3 Messungen zusammen und beziehen sich auf eine theoretische Ausbeute bei einer 1 : 1-Stöchiometrie von Serin zu SRS im aktivierten Komplex und quantitativer Bindung an das Filter. Blindwerte der Radioaktivität bei Inkubation der Synthetase in Abwesenheit von ATP wurden abgezogen.

*Diese Bedingungen entsprechen im wesentlichen den Angaben in (66).

tivität getestet. Ein weiterer Teil der Reaktionslösung wurde mit dem Standard-Filtrationspuffer verdünnt und über ein Nitrocellulose-Filter abgesaugt. Zum dritten Aliquot des Reaktionsansatzes wurde eine Lösung von $tRNA^{Ser}$ und einem Überschuß an [^{12}C]-Serin zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von etwa einer Sekunde wurde TCA zugegeben und die Radioaktivität der synthetisierten Seryl-$tRNA^{Ser}$ bestimmt. Setzt man die Ausbeute an aktiviertem Komplex im Filterbindungsexperiment als loo % an, so wurden ca. 95 % des aktivierten Serins auf die $tRNA^{Ser}$ transferiert. Bei der Isolierung über Molekularsieb-Chromatographie war dagegen die Ausbeute an aktiviertem Komplex um ca. lo % höher als bei der Adsorption an die Membranfilter. Dieser Unterschied ist möglicherweise dadurch bedingt, daß während der chromatographischen Isolierung des Komplexes schwach gebundenes Serin nicht vollständig abgetrennt worden ist.

Wurde im Reaktionsansatz der Aktivierung die Synthetasekonzentration variiert, so zeigte sich in den Filterbindungsexperimenten eine lineare Beziehung zwischen der eingesetzten Synthetasemenge und der adsorbierten Radioaktivität (Abb. 4.1.). Dieser Befund stellt sicher, daß die Effizienz der Komplexbindung im untersuchten Bereich der Synthetasekonzentration nicht durch die Adsorptionskapazität des Filters limitiert wird.

Alle Ergebnisse sprechen also dafür, daß der Filterbindungstest unter den optimierten Bedingungen einen quantitativen Nachweis des aktivierten Komplexes ermöglicht. Zugleich bestätigen die Resultate auch die in (66) angegebene 1 : 1-Stöchiometrie zwischen Serin und SRS im aktivierten Komplex bei Anwesenheit von Pyrophosphatase. Wurde im Reaktionsansatz für die Aktivierung nicht die Aminosäure sondern das

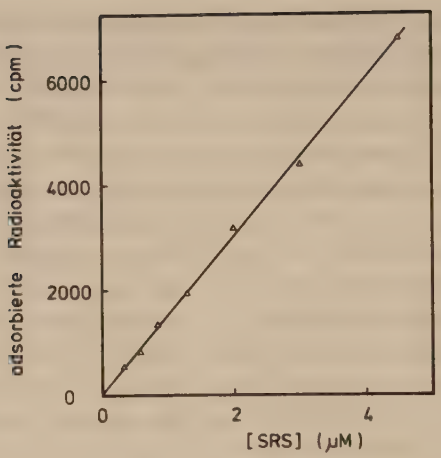


Abb. 4.1.: Abhängigkeit zwischen der Menge an Filter-gebundenem aktiviertem Komplex und der eingesetzten Synthetasemenge. Die Reaktionslösung enthielt in 100 µl: 0,5 mM [^{14}C]-Serin, 5 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$, 3 U/ml Pyrophosphatase und SRS in den angegebenen Konzentrationen. Experimentelle Details des Nitrocellulosefilter-Bindungstest siehe Tab. 4.1.

ATP [^{14}C]-markiert eingesetzt (Konzentration 300 µM), so zeigten die Filterbindungsversuche, ebenfalls in Übereinstimmung mit (66), in Gegenwart von Pyrophosphatase eine Stöchiometrie von 1 $\pm$ 0,15 Nukleotid pro Synthetase für den aktivierten Komplex. Wurde stattdessen unter sonst gleichen Bedingungen [γ-^{32}P]-ATP verwendet, so entsprachen die Werte an Filter-adsorbierter Radioaktivität einem Verhältnis von weniger als 0,07 Mol ATP pro Mol Synthetase. Diese Befunde

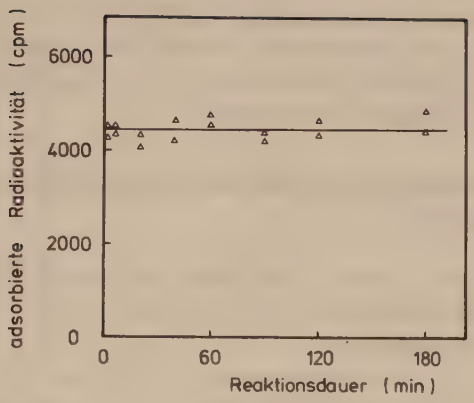


Abb. 4.2.: Ausbeute an aktiviertem Komplex im Filterbindungsexperiment nach verschiedenen Inkubationszeiten für die Aktivierungsreaktion. Konzentrationen in der Reaktionslösung (1oo µl): 3 µM SRS, o,5 mM [^{14}C]-Serin, 5 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$ und 3 U/ml Pyrophosphatase.

stehen in Einklang mit der Annahme, daß die Aminosäure im aktivierten Komplex als Seryl-Adenylat gebunden vorliegt.

In Filterbindungsexperimenten, bei denen die Inkubationszeit für die Aktivierungsreaktion variiert wurde, zeigten sich auch nach längerer Reaktionsdauer keine Veränderungen in der Stöchiometrie zwischen aktivierter Aminosäure und Synthetase (Abb. 4.2.). Dieses Ergebnis schließt eine langsame Aktivierung eines zweiten Aminosäuremoleküls, zumindest in einer Filter-absorbierbaren stabilen Form, wie sie bei anderen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen gefunden wurde (7o), aus. Offen-

sichtlich kann sich, obwohl die SRS aus zwei wahrscheinlich identischen Untereinheiten besteht, ein stabiler, symmetrischer SRS·$(Ser\text{-}AMP)_2$-Komplex unter den gegebenen experimentellen Bedingungen nicht bilden.

4.1.2. Konzentrationsabhängigkeiten des Aktivierungsgleichgewichts

Mit Hilfe des Filterbindungstests wurde der Einfluß der Substrat- und Produktkonzentration auf das Gleichgewicht der Aktivierung untersucht.

Bei Variation der Serin-Konzentration in der Reaktionslösung zeigte sich eine Abhängigkeit der Konzentration des aktivierten Komplexes von der Aminosäurekonzentration, die durch ein einfaches Bindungsgleichgewicht erklärt werden kann (Abb. 4.3.). Die Auswertung ergab eine Dissoziationskonstante von 4o µM, die mit dem in Aminoacylierungskinetiken bestimmten K_M-Wert für Serin (12) übereinstimmt. Durch Sättigung der Synthetase mit Aminosäure konnte in Abwesenheit von Pyrophosphatase eine maximale Stöchiometrie von o,5 Mol aktiviertem Serin pro Mol SRS erreicht werden.

Veränderungen der ATP-Konzentration beeinflußten in komplexer Weise das Gleichgewicht der Aktivierung. Die Stöchiometrie zwischen aktiviertem Serin und Synthetase nahm mit steigender ATP-Konzentration zu, erreichte bei 1 mM ATP ein Maximum von o,5 und ging bei höheren ATP-Konzentrationen wieder zurück (Abb. 4.4.). Die komplizierte ATP-Abhängigkeit des Aktivierungsgleichgewichts läßt sich mit spezifischen Einflüssen von Mg^{2+}-Ionen und Pyrophosphat erklären, deren Konzentrationen bei der Variation der ATP-Konzentration ebenfalls verändert wurden. Eine quantitative Auswertung mit

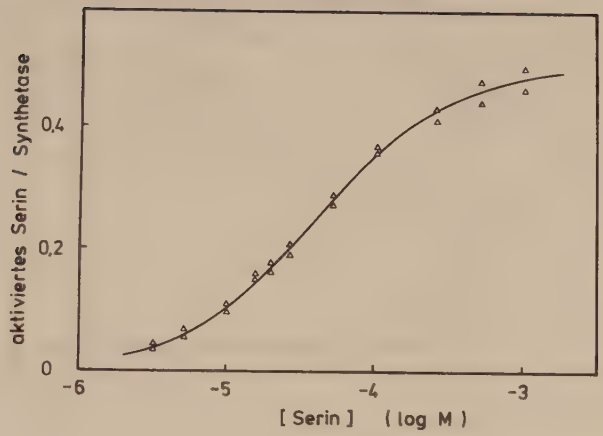


Abb. 4.3.: Einfluß der Serinkonzentration auf das Gleichgewicht der Aktivierung. Die Konzentration des aktivierten Komplexes wurde im Filterbindungstest bestimmt. Die Reaktionslösung (loo µl) enthielt: 3 µM SRS, 5 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$ und [^{14}C]-Serin in den angegebenen Konzentrationen.

Hilfe des einfachen Bindungsmodells war nicht möglich, qualitative Abschätzungen sprachen jedoch für eine Dissoziationskonstante von ca. loo µM für ATP. Dieser Wert stimmt mit dem aus Aminoacylierungskinetiken bei optimaler $MgCl_2$-Konzentration ermittlten K_M-Wert für ATP (1,6 mM, Abb. 3.4.) nicht überein, obwohl die Versuche unter diesen Mg^{2+}-Bedingungen durchgeführt worden waren. Eine vergleichbare Größenordnung besitzt jedoch der K_M-Wert für ATP bei Aminoacylierung unter Mg^{2+}-Überschuß (Abb. 3.4., (12)).

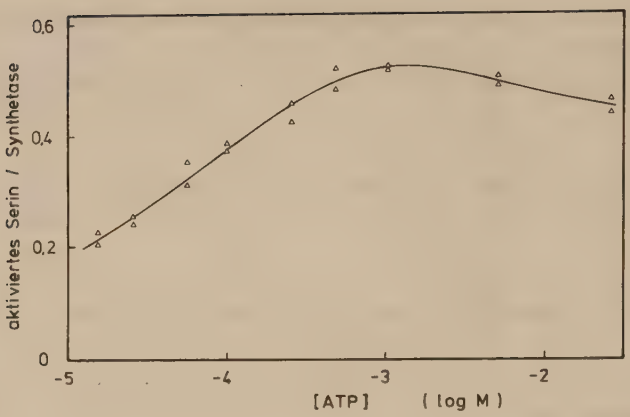


Abb. 4.4.: Änderungen der Gleichgewichtslage bei Variation der ATP-Konzentration. Die Analyse des Aktivierungsgleichgewichts erfolgte durch Filterbindung. Die Reaktionslösung enthielt in 100 µl: 3 µM SRS, 0,5 mM [^{14}C]-Serin und ATP in den angegebenen Konzentrationen. Die $MgCl_2$-Konzentration betrug 1,5 mM bei ATP-Konzentrationen bis 250 µM, 1,7 mM bei 500 µM ATP, 2 mM bei 1 mM ATP, 5 mM bei 5 mM ATP und 25 mM bei 25 mM ATP.

Auch bei Variation der Konzentration an Mg^{2+}-Ionen veränderte sich das Gleichgewicht der Aktivierung in komplexer Weise. Die Versuche, die unter weitgehender Substratsättigung (500 µM Serin und 5 mM ATP) durchgeführt wurden, ergaben eine maximale Stöchiometrie von 0,8 Mol aktiviertem Serin pro Mol Synthetase bei 3 mM $MgCl_2$ (Abb. 4.5.). Sowohl bei niedrigeren wie auch bei höheren $MgCl_2$-Konzentrationen war

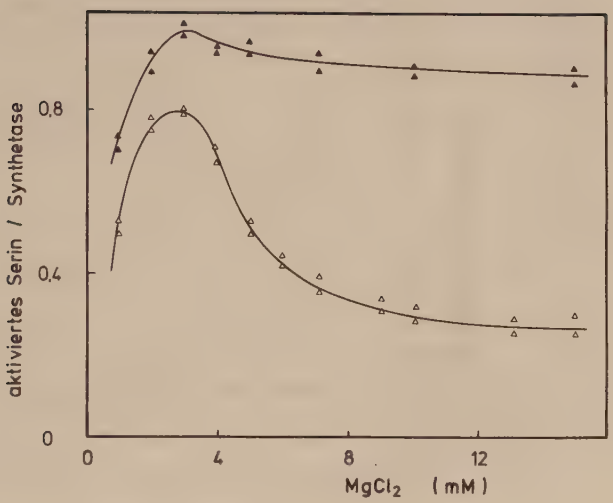


Abb. 4.5.: Abhängigkeit des Aktivierungsgleichgewichts von der Konzentration der Mg^{2+}-Ionen. Der Nachweis des aktivierten Komplexes erfolgte im Filterbindungsexperiment. Konzentrationen in der Reaktionslösung (100 µl): 3 µM SRS, 0,5 mM [^{14}C]-Serin, 5 mM ATP und $MgCl_2$ wie angegeben (△). In einem parallel durchgeführten Experiment enthielt der Reaktionsansatz zusätzlich 3 U/ml Pyrophosphatase (▲).

das Gleichgewicht stärker in Richtung der Edukte verschoben. Die niedrige Stöchiometrie von 0,5 Mol aktiviertem Serin pro Mol SRS, die in den vorangegangenen Experimenten bei Substratsättigung erzielt wurde, erklärt sich also im wesentlichen aus der nicht-optimalen $MgCl_2$-Konzentration bei diesen

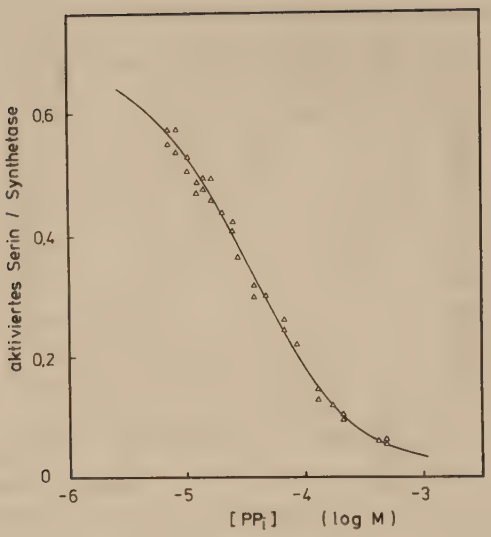


Abb. 4.6.: Einfluß der PP_i-Konzentration auf das Gleichgewicht der Aktivierung. Die Konzentration des aktivierten Komplexes wurde im Filterbindungstest bestimmt. Die Reaktionslösung enthielt in 100 µl: 3 µM SRS, 5 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM [^{14}C]-Serin und PP_i in den angegebenen Konzentrationen.

Versuchen. In Gegenwart von Pyrophospatase wurde bei keiner $MgCl_2$-Konzentration die maximale Stöchiometrie von 1 Mol aktiviertem Serin pro Mol Synthetase überschritten (Abb. 4.5.), ein stabiler SRS·$(Ser\text{-}AMP)_2$-Komplex existiert also auch unter veränderten Mg^{2+}-Bedingungen nicht.

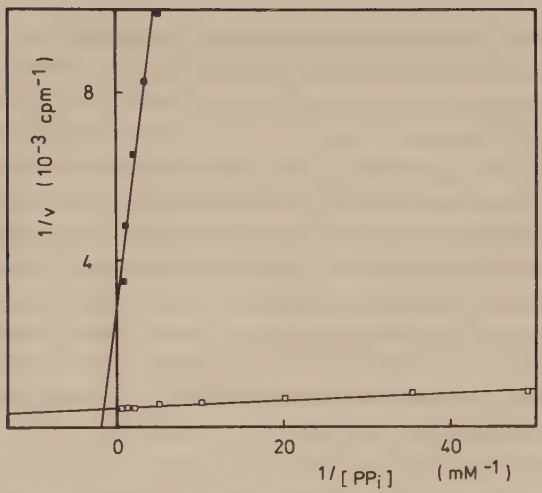


Abb. 4.7.: Vergleich der Anfangsgeschwindigkeiten des PP_i-ATP-Austauschs bei Variation der PP_i-Konzentration in Abwesenheit (□) und in Gegenwart (■) von $tRNA^{Ser}$. Substrat-Konzentrationen im Austauschexperiment: ATP 5 mM, $MgCl_2$ 7 - 9 mM, angepaßt an die PP_i-Konzentration, Serin o,5 mM, $tRNA^{Ser}$ 18 µM (nur in (■)) und $[^{32}P]$-PP_i wie angegeben.

Quantitative Bestimmungen mit der in (71) beschriebenen Analysemethode ergaben eine o,o8 %ige Verunreinigung des verwendeten ATPs mit Pyrophosphat. Der Reaktionsansatz für die Aktivierung sollte also im Gleichgewicht bei einer ATP-Konzentration von 5 mM und einer Synthetasekonzentration von 3 µM etwa 5 - 6 µM Pyrophospat enthalten. Wurde der Reakti-

onslösung weiteres Pyrophosphat zugesetzt, so zeigte sich im Filterbindungstest eine Abnahme der Konzentration des aktivierten Komplexes, die einer Dissoziationskonstante von 25 µM entspricht (Abb. 4.6.). Aus PP_i-ATP-Austauschexperimenten bei gleicher ATP- und Serinkonzentration ließ sich ein K_M-Wert von 2o µM für Pyrophosphat ableiten (Abb. 4.7.). Pyrophosphat bindet also in Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$ mit hoher Affinität an den aktivierten Komplex und bewirkt schon in relativ niedrigen Konzentrationen eine Verschiebung des Aktivierungsgleichgewichts auf die Seite des Substrat-Komplexes. Dieser Befund macht verständlich, daß eine vollständige Aktivierung nur in Gegenwart von Pyrophosphatase beobachtet werden konnte.

In PP_i-ATP-Austauschversuchen in Gegenwart von $tRNA^{Ser}$ wurde ein K_M-Wert von o,6 mM für Pyrophosphat gemessen (Abb. 4.7.). Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie der K_i-Wert für Pyrophosphat bei der Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$ (o,76 mM, (19)). Die Hemmung des Austauschs durch die $tRNA^{Ser}$ entsprach einem gemischten Hemmtyp. Daraus läßt sich ableiten, daß die Anwesenheit der $tRNA^{Ser}$ nicht nur die Konzentration des aktivierten Komplexes reduziert, sondern auch die Dissoziationskonstante des Pyrophosphats beeinflußt.

4.1.3. Geschwindigkeit der Aktivierung in Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$. Stöchiometrie der ATP-Hydrolyse

Für die Geschwindigkeit der Aktivierung in Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$ konnte in PP_i-ATP-Austauschexperimenten nur ein unterer Grenzwert ermittelt werden (Abb. 3.8.). Deshalb wurde der Versuch unternommen, diese Geschwindigkeit anhand der Hydrolyse von ATP direkt zu messen.

Die Synthetase wurde mit einer Lösung von [γ-^{32}P]-ATP, $MgCl_2$, Serin und Pyrophosphatase rasch gemischt. Nach kurzen Inkubationszeiten im Sekundenbereich wurde die Reaktion gestoppt und die Konzentration des freigesetzten [^{32}P]-Phosphats bzw. -Pyrophosphats bestimmt. Diese Konzentration stieg zunächst rasch an und näherte sich dann einem Grenzwert, der einer Hydrolyse von 1,8 - 1,9 Mol ATP pro Mol SRS entspricht (Abb. 4.8.). Wurde die ATP-Hydrolyse ohne Zusatz von Pyrophosphatase gemessen, so waren bei einer ATP-Konzentration von 160 µM nach Ablauf der Aktivierung etwa 0,9 Mol ATP pro Mol SRS hydrolysiert (Abb. 4.8.). Unter den gleichen Bedingungen wurde im Filterbindungstest und im Transferexperiment eine Stöchiometrie von 1 bzw. 0,4 Mol aktiviertem Serin pro Mol SRS in Gegenwart oder in Abwesenheit von Pyrophosphatase gefunden. Diese Ergebnisse zeigen, daß für jedes aktivierte Serin, das über Membran-Adsorption oder durch den Transfer auf $tRNA^{Ser}$ nachgewiesen werden kann, etwa 2 Moleküle ATP hydrolysiert werden. Wurde statt [γ^{32}P]-ATP als radioaktive Verbindung [^{14}C]-ATP eingesetzt, so ergab die Auftrennung des Produktgemischs (Kap. 3.2.3.) nach Ablauf der Aktivierungsreaktion in Gegenwart von Pyrophosphatase eine Stöchiometrie von 1,2 - 1,5 Mol AMP bzw. Seryl-AMP pro Mol Synthetase. Offensichtlich führt die ATP-Hydrolyse während der Aktivierung von Serin nicht ausschließlich zur Bildung von AMP.

Die Zeitkurve der ATP-Hydrolyse in Abwesenheit von Pyrophosphatase ließ sich durch eine einfache Exponentialfunktion wiedergeben (Abb. 4.8.). Anpassungen ergaben eine Geschwindigkeitskonstante von 1,2 s^{-1} bei 160 µM ATP und von 0,07 s^{-1} bei 16 µM ATP. Aufgrund einer erheblichen Streuung der Meßpunkte, die sich aus technischen Gründen nicht verringern ließ, sind diese Werte mit einer Unsicherheit von etwa $\pm$ 30 %

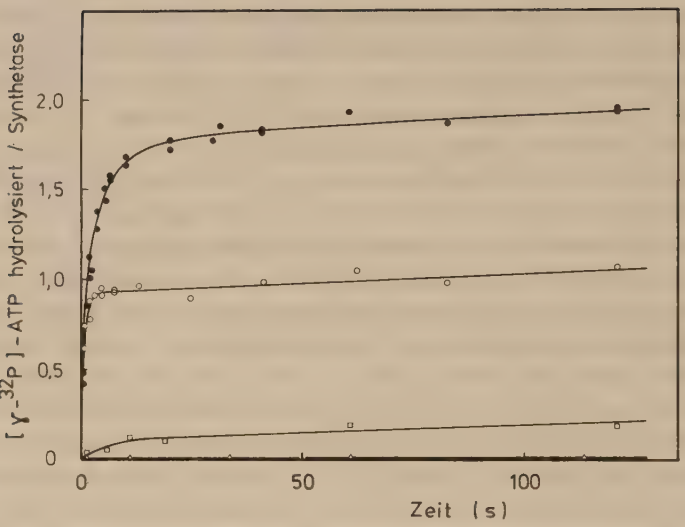


Abb. 4.8.: Kinetik der Aktivierung in Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$: Zeitkurven der ATP-Hydrolyse. Die Reaktion wurde durch rasches Mischen der Synthetase mit den Substraten gestartet. Konzentrationen in der Reaktionslösung: (○) 3 µM SRS, 160 µM [γ-^{32}P]-ATP, 1,5 mM $MgCl_2$ und 0,5 mM Serin. In (●) enthielt der Reaktionsansatz zusätzlich 3 U/ml Pyrophosphatase. Die Blindwerte der ATP-Hydrolyse wurden in Abwesenheit von Serin (□) oder von SRS (△) gemessen. Nach den angegebenen Zeiten wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 %iger Perchlorsäure gestoppt. Details zur Aufarbeitung des Produktgemischs siehe Methoden.

behaftet. Ein Vergleich mit der Geschwindigkeit der Aminoacylierung (o,14 s^{-1} bei 16o µM ATP (Abb. 4.9.), o,o12 s^{-1} bei 16 µM ATP) zeigt, daß die Aktivierung von Serin in Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$ um eine Größenordnung schneller abläuft als die Aminoacylierungsreaktion. Da die Geschwindigkeitskonstante der Aktivierung von der ATP-Konzentration abhängt, ist bei niedrigen Konzentrationen möglicherweise die Assoziation des ATPs geschwindigkeitslimitierend. Die Konzentrationsabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante läßt sich jedoch auch erklären, wenn man annimmt, daß ATP zusätzliche Bindungsstellen an der Synthetase besetzen und als Effektor die Geschwindigkeit der Katalyse beeinflussen kann. Für diese Interpretation spricht, daß in Gleichgewichtsmessungen mehr als zwei Bindungsstellen für ATP gefunden wurden (13).

Die Zeitkurve der ATP-Hydrolyse in Gegenwart von Pyrophosphatase zeigte einen mehrphasigen Verlauf (Abb. 4.8.). Kurvenanpassungen wurden über Addition zweier Exponentialfunktionen durchgeführt, dabei wurden für eine der beiden Funktionen die Werte für Amplitude und Geschwindigkeitskonstante verwendet, die aus dem Experiment ohne Zusatz von Pyrophosphatase gewonnen worden waren. Auf diese Weise ergaben sich für die zweite Reaktion Geschwindigkeitskonstanten von o,2 $\pm$ o,o8 s^{-1} bei 16o µM ATP und o,o8 $\pm$ o,o3 s^{-1} bei 16 µM ATP. Da diese zusätzliche ATP-Hydrolyse nur in Gegenwart von Pyrophosphatase beobachtet wurde, handelt es sich hierbei wohl um eine langsame Verschiebung des Aktivierungsgleichgewichts aufgrund der Pyrophosphat-Hydrolyse durch die Pyrophosphatase.

Ein merklicher ATP-Verbrauch trat auch auf, wenn die Synthetase mit einer Substratlösung gemischt wurde, die lediglich [γ-^{32}P]-ATP, $MgCl_2$ und Pyrophosphatase, aber kein Serin ent-

hielt. Die Zeitkurve der ATP-Hydrolyse zeigte unter diesen Bedingungen gleichfalls einen exponentiellen Anstieg zu Beginn der Reaktion, allerdings mit kleiner Amplitude und Geschwindigkeitskonstante (Abb. 4.8.). Dieser Befund legt die Annahme nahe, daß die Synthetase von der Präparation her noch geringe Mengen an freiem Serin enthält. Im Anschluß an die exponentielle Phase nahm die Menge des hydrolysierten ATPs linear mit der Zeit zu. Für diese Reaktion wurden Geschwindigkeiten von ca. $1o^{-3}$ s^{-1} bei einer ATP-Konzentration von 16o µM und ca. 2 x $1o^{-4}$ s^{-1} bei 16 µM ATP gemessen. Da die gleichen Geschwindigkeiten der ATP-Hydrolyse auch in Abwesenheit von Pyrophosphatase gefunden wurden, läßt sich der lineare Anteil der Zeitkurve am ehesten damit erklären, daß die Synthetase eine Aminosäure-unabhängige ATPase-Aktivität enthält. In Abwesenheit der Synthetase wurde ATP nur noch sehr langsam abgebaut (Abb. 4.8.). Diese geringfügige ATP-Hydrolyse läßt sich auf eine ATPase-Aktivität des Pyrophosphatase-Präparats und auf die Selbstzerstörung des radioaktiven ATPs zurückführen.

In Gegenwart von Serin zeigte die Geschwindigkeit der ATP-Hydrolyse nach vollständigem Ablauf der Aktivierungsreaktion den gleichen Wert, wie er auch in Abwesenheit von Serin gemessen wurde (Abb. 4.8.). Aus dieser Übereinstimmung läßt sich ableiten, daß eine Dissoziation oder Hydrolyse des aktivierten Serins als Folgereaktion der Aktivierung nicht mit merklicher Geschwindigkeit ablaufen kann. Der aktivierte Komplex ist also unter den vorgegebenen Bedingungen weitgehend stabil.

Um den Einfluß der $tRNA^{Ser}$ auf die Kinetik der Aktivierung zu untersuchen, wurde die ATP-Hydrolyse auch unter Aminoacylierungsbedingungen gemessen. Die Experimente zeigten einen

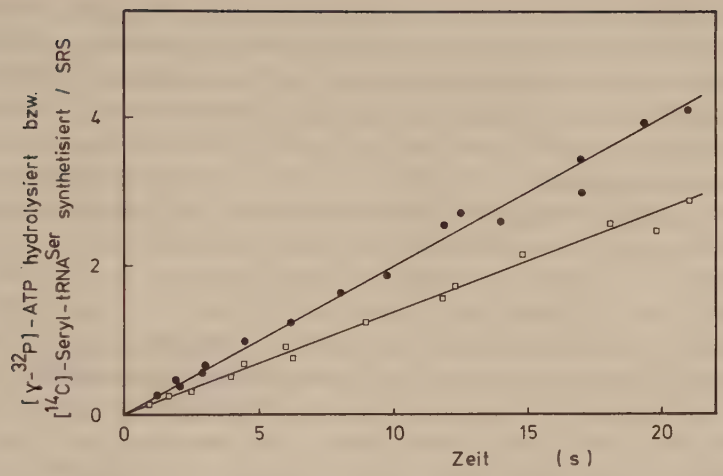


Abb. 4.9.: Kinetik der ATP-Hydrolyse unter Aminoacylierungsdingungen (●). Vergleich mit der Kinetik der Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$ unter den gleichen Bedingungen (□). Die Reaktion wurde durch rasches Mischen der Synthetaselösung mit der Substratlösung gestartet. Konzentrationen in der Reaktionslösung: 3 µM SRS, 160 µM ATP, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM Serin und 30 µM $tRNA^{Ser}$. Im Aminoacylierungstest wurde Serin [^{14}C]-markiert eingesetzt, für die Bestimmung der ATP-Hydrolyse wurde das ATP [γ-^{32}P]-markiert verwendet.

ATP-Verbrauch proportional zur Reaktionsdauer über den ganzen untersuchten Zeitbereich, ein rascher Anstieg der Produktkonzentration zu Anfang der Reaktion wurde nicht beob-

achtet (Abb. 4.9.). Dieser Befund ist in Kap. 3.2.3. bereits als Hinweis diskutiert worden, daß die Aktivierung von Serin unter Aminoacylierungsbedingungen nicht wesentlich schneller abläuft als der gesamte Prozeß der Aminoacylierung. Die Gegenwart der $tRNA^{Ser}$ bewirkt also eine Verringerung der Aktivierungsgeschwindigkeit. Ein Vergleich der Zeitkurven der ATP-Hydrolyse und der Aminoacylierung, die unter gleichen Bedingungen gemessen worden waren, ergab einen Verbrauch von 1,4 - 1,6 Molekülen ATP pro synthetisierte Seryl-$tRNA^{Ser}$ (Abb. 4.9.). Dieses Verhältnis konnte auch in Doppelmarkierungsexperimenten bestätigt werden, bei denen $[\gamma\text{-}^{32}P]$-ATP und $[^{14}C]$-Serin gleichzeitig eingesetzt wurden, so daß die ATP-Hydrolyse und die Beladung der $tRNA^{Ser}$ in derselben Produktlösung bestimmt werden konnte. Die Gegenwart der $tRNA^{Ser}$ bewirkt also auch eine Reduzierung des ATP-Verbrauchs bei der Aktivierung von Serin.

Faßt man die Ergebnisse der beschriebenen Untersuchungen zusammen, so erscheint die Aktivierung von Serin als ein komplizierter Prozeß, der durch das einfache Reaktionsmodell

$$\text{SRS} + \text{ATP} + \text{Serin} \rightleftharpoons \text{SRS Seryl-AMP} + PP_i$$

nur unzureichend beschrieben wird. Im Verlauf der Aktivierungsreaktion werden in Gegenwart von Pyrophosphatase etwa 2 Mol ATP pro Mol Synthetase hydrolysiert. 60 - 75 % des verbrauchten ATPs lassen sich nach Ablauf der Aktivierung in der Reaktionslösung als AMP bzw. Seryl-AMP nachweisen. Im Filterbindungstest findet man unter den gleichen Bedingungen 1 Mol Seryl-AMP pro Mol SRS. Ob die überschüssige ATP-Hydrolyse darauf zurückzuführen ist, daß neben Seryl-Adenylat noch andere, eventuell instabile Formen der aktivierten Aminosäure gebildet werden, kann aufgrund der vorhandenen

Daten nicht entschieden werden. In Gegenwart von Pyrophosphatase läßt sich jedenfalls die gleiche Menge Serin, die im Filterbindungstest als Synthetase-gebundenes Seryl-Adenylat gefunden wird, auch vom aktivierten Komplex auf $tRNA^{Ser}$ transferieren. Im folgenden Kapitel sind Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit der Transferamplitude beschrieben, die einen Vergleich mit der Adenylatbildung auch in Abwesenheit von Pyrophosphatase gestatten.

4.2. Transfer des aktivierten Serins auf $tRNA^{Ser}$: Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit der Transfergeschwindigkeit

Um das Gleichgewicht der Bindung zwischen $tRNA^{Ser}$ und aktiviertem Komplex zu charakterisieren und um einen Vergleich mit den im Filterbindungstest ermittelten Gleichgewichtsdaten der Aktivierung zu ermöglichen, wurde in einer Serie von quenched-flow-Experimenten die Konzentrationsabhängigkeit der Transferamplitude gemessen. Gleichzeitig konnte mit diesen Experimenten auch der Einfluß der Substratkonzentration auf die Geschwindigkeitskonstante des Transfers bestimmt werden.

Die quenched-flow-kinetischen Versuche wurden wie in Kap. 3.2.4. beschrieben durchgeführt und ausgewertet. Abb. 4.1o. zeigt Werte der Transferamplitude und der Geschwindigkeitskonstante, die aus Experimenten bei unterschiedlichen $tRNA^{Ser}$-Konzentrationen ermittelt wurden. Bei einer ATP-Konzentration von 5 mM wurde für die Menge des transferierten Serins eine Konzentrationsabhängigkeit beobachtet, die einer Bindung der $tRNA^{Ser}$ mit einer Dissoziationskonstante von o,59 µM entspricht. Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, daß die

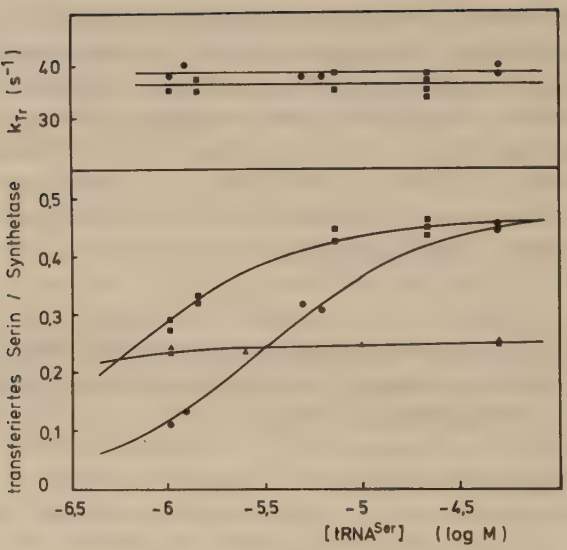


Abb. 4.1o.: Einfluß der $tRNA^{Ser}$-Konzentration auf die Kinetik der Transferreaktion. Die Angaben zur Geschwindigkeitskonstanten des Transfers (k_{Tr}) und zur Menge des transferierten Serins resultieren aus der quantitativen Auswertung von Zeitkurven der Aminoacylierung, die in quenched-flow-Experimenten bei den angegebenen $tRNA^{Ser}$-Konzentrationen gemessen wurden. Die Versuche wurden bei drei verschiedenen ATP-Konzentrationen durchgeführt: 25 mM ATP/25 mM $MgCl_2$ (●), 5 mM ATP/5 mM $MgCl_2$ (■) und o,1 mM ATP/1,5 mM $MgCl_2$ (▲). Die Synthetasekonzentration betrug 3 µM, die Konzentration von [^{14}C]-Serin o,5 mM bei o,1 mM und 5 mM ATP und 1 mM bei 25 mM ATP.

Affinität der $tRNA^{Ser}$ zur Synthetase von der ATP-Konzentration beeinflußt wird (lo, 14, 21). Dieser Befund konnte durch die quenched-flow-Messungen bestätigt werden: Bei einer ATP-Konzentration von 25 mM wurde eine Dissoziationskonstante von 3 µM für $tRNA^{Ser}$ ermittelt, bei loo µM ATP ergab die Auswertung Hinweise auf eine Dissoziationskonstante von ca. o,1 µM. Ein vergleichbarer Wert für die Dissoziationskonstante (o,o7 µM) ist in fluorimetrischen Gleichgewichtsmessungen der Bindung von $tRNA^{Ser}$ und SRS in Gegenwart von loo µM ATP gefunden worden (lo). Offensichtlich bindet die $tRNA^{Ser}$ an den SRS-ATP-Komplex und an den aktivierten Komplex mit etwa gleicher Affinität. Weitgehende Übereinstimmung besteht auch zwischen den quenched-flow-kinetisch ermittelten Dissoziationskonstanten und K_M-Werten für $tRNA^{Ser}$, die in Aminoacylierungskinetiken unter Fließgleichgewichtsbedingungen bei vergleichbaren ATP-Konzentrationen gemessen worden sind (72). Die Variation der $tRNA^{Ser}$-Konzentration hatte keinen Einfluß auf die Geschwindigkeitskonstante des Transfers. Dieses Ergebnis bestätigt, daß der bimolekulare Assoziationsschritt im Prozeß der tRNA-Bindung nicht geschwindigkeitslimitierend für die Transferreaktion ist.

Wurden die quenched-flow-Experimente bei verschiedenen Serinkonzentrationen durchgeführt, so zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit der Transferamplitude, die einer Dissoziationskonstanten von 4o µM für Serin entspricht (Abb. 4.11.). Die Menge des transferierten Serins stimmt über den ganzen untersuchten Konzentrationsbereich mit der Ausbeute an aktiviertem Komplex im Filterbindungstest (Abb. 4.3.) überein. Überraschenderweise änderte sich die Geschwindigkeitskonstante des Transferschrittes bei Variation der Serinkonzentration. Bei Serinkonzentrationen unter 2o µM wurde ein Wert von $18 \pm 2\ s^{-1}$ für k_{Tr} gemessen (Abb. 4.11.). Offen-

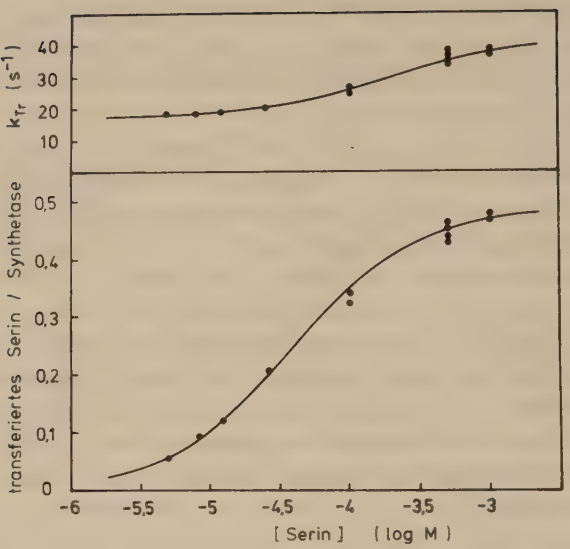


Abb. 4.11.: Abhängigkeit der Transferamplitude und der Geschwindigkeitskonstante des Transfers von der Serinkonzentration. Die aufgeführten Daten sind Ergebnisse der quantitativen Auswertung von Zeitkurven der Aminoacylierung, die in quenched-flow-Experimenten bei den angegebenen Konzentrationen an [^{14}C]-Serin gemessen wurden. Die Konzentration der übrigen Reaktanden betrug: 3 µM SRS, 5 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$ und 21 µM $tRNA^{Ser}$.

bar limitiert unter diesen Bedingungen nicht mehr die auf die tRNA-Assoziation folgende langsame Umlagerung des $tRNA^{Ser}$-Synthetase-Komplexes die Geschwindigkeit der Transferreaktion

(Kap. 3.2.4.), sondern ein nachfolgender Schritt bei der Übertragung des Serins vom Adenylat auf die $tRNA^{Ser}$. Bei höheren Serinkonzentrationen stieg die Geschwindigkeitskonstante bis auf einen Wert von $4o \pm 5\ s^{-1}$ an. Dieser Befund läßt sich nur mit der Annahme erklären, daß zwei Bindungsstellen für Serin in den Transferprozeß involviert sind: An einer Bindungsstelle der Synthetase (K_D = 4o µM) wird Serin aktiviert und auf $tRNA^{Ser}$ übertragen, die Besetzung der zweiten Bindungsstelle (K_D = 2oo µM) beeinflußt die Geschwindigkeit der Übertragung.

Bei Variation der ATP-Konzentration in den quenched-flow-Transferexperimenten ergab sich für die Menge des transferierten Serins die gleiche komplexe ATP-Abhängigkeit (Abb. 4.12.), die bereits in den Filterbindungsversuchen für die Gleichgewichtskonzentration des aktivierten Serins gefunden worden war (Abb. 4.4.). Lediglich bei sehr hohen ATP-Konzentrationen ist die Transferamplitude etwas kleiner als die Ausbeute an aktiviertem Komplex. Dieser Unterschied läßt sich mit dem antagonistischen Effekt des ATPs auf die Bindung der $tRNA^{Ser}$ (Abb. 4.1o.) erklären. Die Geschwindigkeitskonstante des Transfers änderte sich bei der Variation der ATP-Konzentration nicht (Abb. 4.12.).

Sowohl die Transferamplitude als auch die Geschwindigkeitskonstante des Transfers zeigten eine ausgeprägte Abhängigkeit von der Konzentration der Mg^{2+}-Ionen (Abb. 4.13.). Die in den quenched-flow-Versuchen bei verschiedenen $MgCl_2$-Konzentrationen gemessenen Ausbeuten an transferiertem Serin reflektieren im wesentlichen die komplexe Mg^{2+}-Abhängigkeit des Aktivierungsgleichgewichts (Abb. 4.5.). Abweichungen von der Übereinstimmung zwischen Transferamplitude und Gleichgewichtskonzentration des aktivierten Serins wurden nur bei

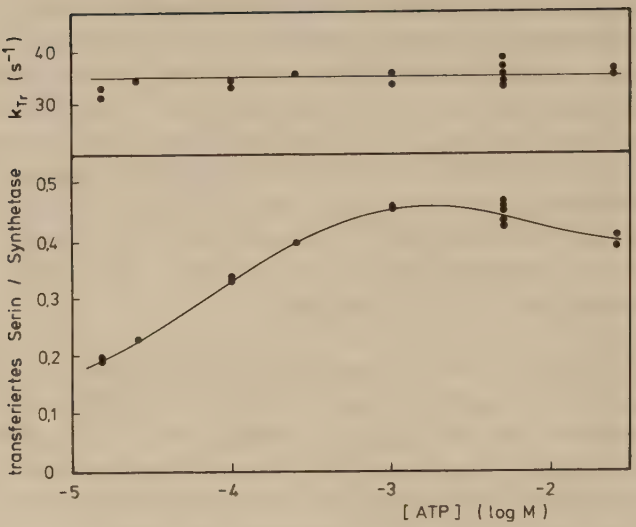


Abb. 4.12.: Einfluß der ATP-Konzentration auf die Kinetik der Transferreaktion. Die angegebenen Werte der Geschwindigkeitskonstante des Transfers und der Transferamplitude sind Resultate aus der quantitativen Auswertung von Zeitkurven der Aminoacylierung, die in quenched-flow-Experimenten bei den aufgeführten ATP-Konzentrationen gemessen wurden. Die SRS-Konzentration in diesen Versuchen betrug 3 µM, die Konzentration an [^{14}C]-Serin war o,5 mM. $MgCl_2$ wurde in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 1,5 mM bei ATP-Konzentrationen bis 25o µM, 1,7 mM bei 5oo µM ATP, 2 mM bei 1 mM ATP, 5 mM bei 5 mM ATP und 25 mM bei 25 mM ATP.

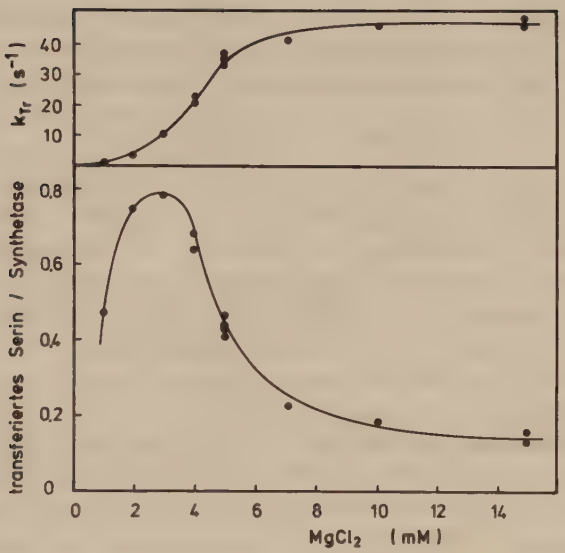


Abb. 4.13.: Abhängigkeit der Transferamplitude und der Geschwindigkeitskonstante des Transfers von der Konzentration der Mg^{2+}-Ionen. Die aufgeführten kinetischen Daten sind aus Zeitkurven der Aminoacylierung ermittelt, welche in quenched-flow-Experimenten bei den angegebenen $MgCl_2$-Konzentrationen gemessen wurden. Die Konzentration der übrigen Reaktanden in der Reaktionslösung betrug: 3 µM SRS, 5 mM ATP, o,5 mM [^{14}C]-Serin und 21 µM $tRNA^{Ser}$.

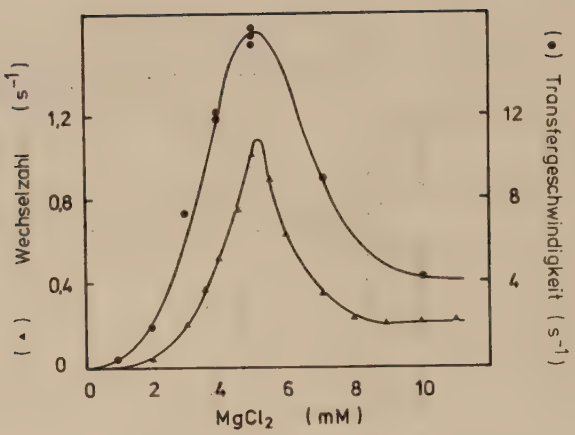


Abb. 4.14.: Vergleich der Mg^{2+}-Abhängigkeiten der Transfergeschwindigkeit (s. Text) und der Geschwindigkeit der Aminoacylierung im quasi-stationären Zustand.

höheren $MgCl_2$-Konzentrationen beobachtet, hier übertraf die Ausbeute an aktiviertem Komplex die Menge des transferierten Serins. Eine einfache Begründung für diese Divergenz der Meßergebnisse läßt sich nicht anführen. Die Geschwindigkeitskonstante des Transfers stieg von ca. 1 s^{-1} bei 1 mM $MgCl_2$ bis auf 45 $\pm$ 5 s^{-1} bei lo mM $MgCl_2$ und höheren $MgCl_2$-Konzentrationen. Diese Mg^{2+}-Abhängigkeit läßt sich mit einem einfachen Bindungsgleichgewicht zwischen Mg^{2+}-Ionen und ATP allein nicht ausreichend erklären. Zusätzlich muß man auch eine kinetisch relevante, hoch-kooperative Bindung von Mg^{2+}-Ionen an die $tRNA^{Ser}$, möglicherweise auch an die Synthetase, annehmen, die bei einer Konzentration an freien Mg^{2+}-Ionen von etwa 5 mM eine Sättigung erreicht. Multipliziert man die

Werte für Amplitude und Geschwindigkeitskonstante des Transfers, so erhält man die Mg^{2+}-Abhängigkeit der Transfergeschwindigkeit. Diese Abhängigkeit stimmt qualitativ mit der Abhängigkeit der Aminoacylierungsgeschwindigkeit von der Konzentration an Mg^{2+}-Ionen überein (Abb. 4.14.).

Der Einfluß der Produkte der Aminoacylierungsreaktion auf die Kinetik des Transfers ist bereits in Kap. 3.2.4. und 3.2.5. beschrieben worden. Quenched-flow-Versuche in Gegenwart von 2oo µM Pyrophosphat hatten eine reduzierte Ausbeute an transferiertem Serin, aber eine unveränderte Geschwindigkeitskonstante des Transfers ergeben (Tab. 3.2.). Um den Vergleich mit der im Filterbindungstest gemessenen Pyrophosphat-Abhängigkeit des Aktivierungsgleichgewichts zu ermöglichen, wurde die Transferamplitude bei verschiedenen Pyrophosphat-Konzentrationen bestimmt (Abb. 4.15.). Als Ergebnis dieses Versuchs läßt sich eine völlige Übereinstimmung zwischen der Menge des transferierten Serins und der Gleichgewichtskonzentration des aktivierten Komplexes über den ganzen untersuchten Konzentrationsbereich feststellen. Geht man davon aus, daß im Filterbindungstest die Summe der Adenylat-Komplexe SRS·Ser-AMP und SRS·Ser-AMP·PP_i bestimmt wird, so läßt diese Übereinstimmung darauf schließen, daß die $tRNA^{Ser}$ auch in Gegenwart von Pyrophosphat an den aktivierten Komplex bindet.

Der Vergleich zwischen den Ergebnissen der Transferexperimente und der Filterbindungsversuche zeigt also, daß die Ausbeute an transferiertem Serin und die Gleichgewichtskonzentration des aktivierten Komplexes bei allen untersuchten Substrat- und Produktkonzentrationen praktisch identisch sind (wenn man von der kleineren Transferamplitude bei hohen $MgCl_2$-Konzentrationen als einziger Ausnahme absieht). Aus

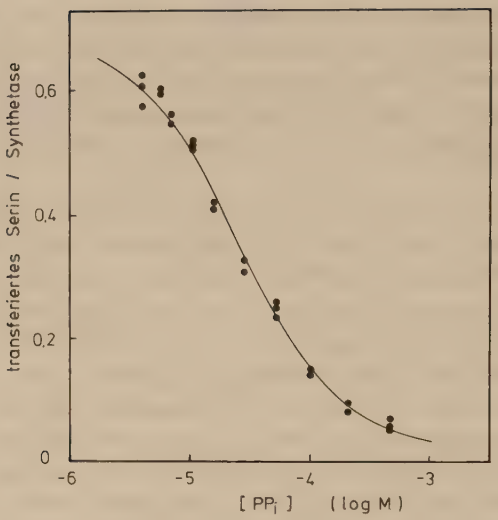


Abb. 4.15.: Pyrophosphat-Abhängigkeit der Transferamplitude. SRS (6 µM) wurde mit ATP (5 mM), $MgCl_2$ (5 mM), [^{14}C]-Serin (o,5 mM) und Pyrophosphat in den angegebenen Konzentrationen 15 min präinkubiert und dann mit einem gleich großen Volumen $tRNA^{Ser}$ (4o µM), ATP (5 mM), $MgCl_2$ (5 mM), Pyrophosphat und unmarkiertem Serin (5o mM) gemischt. Nach einer Inkubationszeit von ca. 1 s wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 %iger Trichloressigsäure gestoppt und die Menge der gebildeten [^{14}C]-Seryl-$tRNA^{Ser}$ bestimmt.

diesem Befund lassen sich zwei Folgerungen ableiten: (i) Auch in Abwesenheit von Pyrophosphatase und unter den ver-

schiedensten Konzentrationsbedingungen erfolgt der Transfer ausschließlich von dem im Filterbindungstest nachgewiesenen aktivierten Komplex aus, der nach allen experimentellen Kriterien Enzym-gebundenes Seryl-Adenylat enthält. Es gibt keine Hinweise darauf, daß daneben andere Formen der aktivierten Aminosäure existieren, die als Ausgangsverbindung für eine Transferreaktion dienen können. (ii) Änderungen des Aktivierungsgleichgewichts, die z.B. aufgrund einer durch die tRNA-Bindung induzierten Pyrophosphat-Dissoziation (Kap. 4.1.2.) eintreten sollten, sind offensichtlich so langsam, daß sie die Transferamplitude nicht mehr beeinflussen können. Dies steht im Einklang mit der Feststellung, daß die Aktivierung von Serin in Gegenwart von $tRNA^{Ser}$ wesentlich langsamer erfolgt als der Transfer des aktivierten Serins auf die $tRNA^{Ser}$. Die geringen Ausbeuten an transferiertem Serin, die in Abwesenheit von Pyrophosphatase trotz hoher Substratkonzentrationen gemessen wurden, sind also allein durch die ausgeprägte Mg^{2+}- und Pyrophosphat-Abhängigkeit des Aktivierungsgleichgewichts bedingt.

Im Hinblick auf die physiologische Situation in der Zelle erscheint die Frage interessant, ob die Kinetik der Transferreaktion durch die Anwesenheit fremder tRNAs verändert wird. Dieser Frage wurde mit einigen Transferexperimenten nachgegangen, in denen statt reiner $tRNA^{Ser}$ ein $tRNA^{Ser}$-$tRNA^{Phe}$-Gemisch oder unfraktionierte tRNA aus Bierhefe eingesetzt wurde. Tab. 4.2. zeigt die Resultate dieser Versuche. Die Gegenwart der fremden tRNAs hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Transferamplitude, führte aber zu einer Verringerung der Geschwindigkeitskonstante. In Aminoacylierungskinetiken unter Fließgleichgewichtsbedingungen bewirkte der Zusatz der entsprechenden tRNAs eine Verschiebung des Mg^{2+}-Optimums zu höheren Konzentrationen, die Wech-

Tab. 4.2.: Amplitude und Geschwindigkeitskonstante des Transfers in Gegenwart fremder tRNAs.

Konzentrationen in der tRNA-Lösung	Amplitude (%)	k_{Tr} (s^{-1})
5 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$, o,5 mM [^{14}C]-Serin, 42 µM $tRNA^{Ser}$	45 ± 4	35 ± 3
- " - + 12o µM $tRNA^{Phe}$	46	26
- " - + 12o µM $tRNA^{Phe}$, o,8 mM $MgCl_2$	44	34
5 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$, o,5 mM [^{14}C]-Serin, 85o µM unfraktionierte tRNA aus Bierhefe (= 2o µM $tRNA^{Ser}$)	45*)	4*)
- " - + 12 mM $MgCl_2$	41	34

Eine Lösung von 6 µM SRS, 5 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$ und o,5 mM [^{14}C]-Serin wurde 15 min präinkubiert und dann im quenched-flow-Apparat mit einem gleich großen Volumen der angegebenen tRNA-Lösungen gemischt. Die aufgeführten Werte der Transferamplitude (in % der Synthetasekonzentration) und der Geschwindigkeitskonstante des Transfers (k_{Tr}) stammen aus der quantitativen Auswertung der gemessenen Zeitkurven der Aminoacylierung. *) Unter diesen Bedingungen wurde kein rascher Anstieg der Konzentration an Seryl-$tRNA^{Ser}$ während der Anlaufphase der Reaktion beobachtet. Amplitude und Geschwindigkeitskonstante des Transfers ließen sich daher nicht unabhängig von einander ermitteln. Geht man davon aus, daß die Transferamplitude den gleichen Wert wie in den anderen Experimenten besitzt, dann ergibt sich aus der Kurvenanpassung die aufgeführte Geschwindigkeitskonstante des Transfers.

selzahl der Synthetase bei optimaler $MgCl_2$-Konzentration blieb jedoch gleich. Wurde die optimale Konzentration an Mg^{2+}-Ionen auch in den Transferexperimenten (durch Zugabe von $MgCl_2$ zu der tRNA-Lösung) eingestellt, so ergab sich bei unveränderter Transferamplitude für die Geschwindigkeitskonstante ein Wert, welcher dem der Reaktion mit reiner $tRNA^{Ser}$ entspricht. Offensichtlich beeinflußt die fremde tRNA die Kinetik der Transferreaktion nur indirekt über eine Verringerung der Konzentration an freien Mg^{2+}-Ionen. Eine Kompetition mit der $tRNA^{Ser}$ um die Bindungsstelle auf der Synthetase scheint dagegen nicht stattzufinden oder aber die Auswahl der richtigen tRNA erfolgt so schnell, daß sie die Geschwindigkeit des Transferschrittes nicht wesentlich beeinträchtigt. Die Bindung der $tRNA^{Ser}$ und der Transfer des aktivierten Serins auf die $tRNA^{Ser}$ sind also auch unter Bedingungen, die von der tRNA-Konzentration und -Zusammensetzung her den Verhältnissen in der intakten Hefezelle ähneln, schnelle Teilprozesse im Aminoacylierungszyklus.

4.3. Untersuchungen zur Aminosäurespezifität der Seryl-tRNA-Synthetase

Im Rahmen der Charakterisierung der Aktivierungsreaktion und des Transferschrittes wurde auch die Aminosäure-Spezifität der Seryl-tRNA-Synthetase in diesen Teilprozessen untersucht und mit der Aminoacylierung im quasi-stationären Zustand verglichen. Dabei stand die Frage im Vordergrund, ob sich Anzeichen für die Existenz eines Korrekturmechanismus finden lassen, mit dessen Hilfe die Synthetase eine Fehlbeladung der $tRNA^{Ser}$ verhindert.

Alle 2o in die Proteinbiosynthese involvierten Aminosäuren

und zusätzlich auch Homoserin wurden einzeln als radioaktiv markierte Verbindung im Aminoacylierungstest (Substratkonzentrationen: 5 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$, 2o µM $tRNA^{Ser}$ und o,2 - o,5 mM Aminosäure) eingesetzt. Eine Beladung der $tRNA^{Ser}$ unter Fließgleichgewichtsbedingungen wurde nur mit Serin und mit Threonin beobachtet, die Aminoacylierung in Gegenwart von Threonin war jedoch um den Faktor 1/2oo langsamer als Serin. Durch papierchromatographische Auftrennung in verschiedenen Lösungsmittel-Systemen konnte eine geringfügige Verunreinigung der verwendeten Threoninlösung mit Serin (ca. o,4 %) nachgewiesen werden, die aber ausreicht, um die gemessene Aminoacylierungsgeschwindigkeit zu erklären. Wenn eine echte Fehlbeladung der $tRNA^{Ser}$ mit Threonin überhaupt stattfindet, so dürfte sie also mit einer Geschwindigkeit ablaufen, die noch um einiges unter dem experimentell gemessenen Wert liegt. Bei allen anderen verwendeten Aminosäuren lassen sich Aminoacylierungsgeschwindigkeiten, die über o,o5 % der Reaktionsgeschwindigkeit mit Serin hinausgehen, sicher ausschließen. Bei der Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$ kann die Seryl-tRNA-Synthetase also mit hoher Effizienz gegen die falsche Aminosäure diskriminieren.

Wurden die gleichen Versuche statt mit reiner $tRNA^{Ser}$ mit unfraktionierter tRNA durchgeführt, so zeigte sich zwischen den Aminoacylierungsgeschwindigkeiten in Gegenwart von Serin bzw. von Threonin unverändert die Relation von 2oo : 1. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß das Synthetase-Präparat keine Threonyl-tRNA-Synthetase als Verunreinigung enthält. Zusätzlich zu der Aminoacylierung in Gegenwart von Serin oder Threonin wurde unter diesen Bedingungen auch eine Beladung der tRNA mit Leucin beobachtet. Die Reaktionsgeschwindigkeit betrug etwa 6 % der Aminoacylierungsgeschwindigkeit mit Serin. Als mögliche Erklärung für diese zusätzliche Aminoacy-

lierungsaktivität bieten sich zwei Hypothesen an: Entweder vermag die Seryl-tRNA-Synthetase Leucin zu aktivieren und auf eine nicht-zugehörige tRNA zu transferieren oder das verwendete Synthetase-Präparat ist mit Leucyl-tRNA-Synthetase kontaminiert. Die erste Annahme ist relativ unwahrscheinlich, da andere chemisch eng mit Serin verwandte Aminosäuren nicht umgesetzt werden. Für die zweite Hypothese spricht, daß die Leucyl-tRNA-Synthetase aus Bäckerhefe das gleiche Molekulargewicht wie die SRS besitzt, ebenfalls aus zwei gleich großen Untereinheiten besteht und auf ähnliche Weise wie das Serin-spezifische Enzym isoliert werden kann (73). Um weitere Anhaltspunkte für eine Entscheidung zugunsten einer der beiden Erklärungsmöglichkeiten zu erhalten, wurde die Leucin-abhängige Beladung unfraktionierter tRNA mit einer Reihe früher hergestellter SRS-Präparate gemessen und mit der Aminoacylierung in Gegenwart von Serin verglichen. Das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten in Anwesenheit von Serin bzw. von Leucin zeigte in diesen Versuchen eine Enzym-abhängige Variation von 5 : 1 bis 4o : 1. Ein Versuch, das in der vorliegenden Arbeit verwendete Synthetase-Präparat durch erneute Chromatographie an DEAE-Cellulose, Hydroxylapatit und Amberlite CG-5o (7, 19) weiter zu fraktionieren, ergab nur auf der Amberlite-Säule eine partielle Abtrennung von Leucyl-tRNA-Synthetaseaktivität. Nach dieser Rechromatographie wurde Leucin mit einer Geschwindigkeit umgesetzt, die statt 6 % nur noch 2 % der Aminoacylierungsgeschwindigkeit mit Serin betrug. Diese Ergebnisse sprechen für die Annahme, daß die Beladung der unfraktionierten tRNA mit Leucin allein auf die Anwesenheit von Leucyl-tRNA-Synthetase zurückzuführen ist. Ein Grund für die schwierige Separierung der beiden Synthetasen mag neben ihren ähnlichen Elutionseigenschaften im Vorkommen multipler Formen bei der Leucyl-tRNA-Synthetase liegen: Neben den intakten Untereinheiten

heiten vom Molekulargewicht 60000 wurden auch definierte, katalytisch aktive Bruchstücke dieser Untereinheiten gefunden (73) sowie, in jüngster Zeit, eine Synthetase-Form mit dem Molekulargewicht 120000, die keine Untereinheiten-Struktur aufweist und gegenüber der dimeren Leucyl-tRNA-Synthetase leicht veränderte chromatographische Eigenschaften zeigt (74).

Die Aminosäure-Spezifität der Seryl-tRNA-Synthetase bei der Aktivierungsreaktion in Abwesenheit von tRNA wurde mit PP_i-ATP-Austauschexperimenten untersucht. Dabei wurden neben Serin als proteinogene Aminosäuren Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Cystein, Threonin, Prolin, Aparaginsäure, Asparagin, Glutaminsäure und Glutamin eingesetzt. Zusätzlich wurden α-Aminobuttersäure, 2,3-Diaminopropionsäure, Homoserin und Hydroxyprolin als seltene α-Aminosäuren sowie β-Alanin, α- und β-Aminoisobuttersäure und α-Methylserin als Aminosäure-Analoga verwendet. Die Experimente waren so angelegt, daß eine Austauschgeschwindigkeit in der Größenordnung von 0,2 % der Reaktionsgeschwindigkeit mit Serin noch sicher nachgewiesen werden konnte. Außer mit Serin katalysierte die Synthetase auch mit Leucin, Valin und α-Aminobuttersäure sehr effizient und mit Threonin nur langsam einen Einbau des radioaktiven Pyrophosphats in ATP (Tab. 4.3.). Alle anderen aufgeführten Verbindungen, auch chemisch mit Serin nah verwandte Aminosäuren wie Cystein (Austausch der Hydroxylgruppe des Serins gegen eine Thiolgruppe), 2,3-Diaminopropionsäure ($-NH_2$ statt -OH), Alanin (-H statt -OH), Asparaginsäure (-COOH statt -OH) oder α-Methylserin ($-CH_3$ statt -H am α-C-Atom), bewirkten keine signifikante Austauschaktivität. Offensichtlich kann also die Seryl-tRNA-Synthetase bereits bei der Aktivierung in Abwesenheit von tRNA mit großer Genauigkeit zwischen sehr ähnlichen Aminosäure-Molekülstrukturen

Tab. 4.3.: Vergleich der Anfangsgeschwindigkeiten des PP_i-ATP-Austauschs in Gegenwart verschiedener Aminosäuren.

Aminosäure	Konz. (mM)	V (in % der Anfangsgeschwindigkeit in Gegenwart von Serin)	
L-Serin	o,5	1oo	(1oo)
L-Leucin	9,4	36o	(14o)
L-Valin	1o,o	19o	(8o)
L- -Aminobuttersäure	9,6	6o	(25)
L-Threonin	6,1	o,6	(o,4)

Konzentrationen im PP_i-ATP-Austauschexperiment: ATP 5 mM, $MgCl_2$ 6 mM, $[^{32}P]$-PP_i 2o µM und Aminosäure wie angegeben. Die Geschwindigkeitswerte in Klammern sind Ergebnisse aus einem Experiment, bei dem unter sonst identischen Bedingungen die rechromatographierte Synthetase (s. Text) verwendet wurde.

unterscheiden. Damit stellt sich die Frage, ob der Pyrophosphat-Austausch in Gegenwart von Leucin, Valin, α-Aminobuttersäure und Threonin wirklich auf eine Fehlaktivierung dieser Aminosäuren durch die SRS zurückzuführen ist.

Als Kontrolle wurde zunächst die Reinheit der Aminosäuren papierchromatographisch überprüft. Alle Verbindungen wanderten in verschiedenen Lösungsmittel-Systemen als einheitliche Flecke, Verunreinigungen mit Serin wurden nicht entdeckt. Da die Aminosäuren nicht radioaktiv markiert waren, lag das

Auflösungsvermögen der Methode nur bei etwa 1 %, geringere Anteile an Serin ließen sich also nicht mit Sicherheit ausschließen. Zumindest für die Aminosäuren Leucin, Valin und α-Aminobuttersäure kommt aber eine Kontamination mit Serin als Ursache für die gemessenen hohen Austauschgeschwindigkeiten nicht in Betracht.

Läßt sich die Austauschaktivität der SRS in Gegenwart von Leucin mit der in den Aminoacylierungskinetiken nachgewiesenen Verunreinigung durch Leucyl-tRNA-Synthetase begründen oder muß man eine echte Fehlaktivierung von Leucin durch die SRS annehmen, um die hohe Austauschgeschwindigkeit zu erklären? Die Leucyl-tRNA-Synthetase aus E.coli katalysiert den PP_i-ATP-Austausch in Abwesenheit von tRNA etwa 100 mal schneller als die Aminoacylierung von $tRNA^{Leu}$ (75). Überträgt man diesen Befund auf die Leucin-spezifische Synthetase aus Hefe, für die keine Angaben zur Geschwindigkeit des PP_i-ATP-Austauschs veröffentlicht sind, dann ist die gemessene Austauschgeschwindigkeit (Tab. 4.3.) tatsächlich mit einer 5 - 10 %igen Verunreinigung der SRS durch Leucyl-tRNA-Synthetase hinreichend zu begründen. Weitere Argumente gegen eine echte Fehlaktivierung von Leucin durch die SRS ergaben sich aus Resultaten verschiedener anderer Experimente. So konnte mit einer Lösung von 3 µM SRS, 5 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM [^{14}C]-Leucin und 3 U/ml Pyrophosphatase auch nach längeren Inkubationszeiten nur eine maximale Stöchiometrie von 0,1 Mol aktiviertem Leucin pro Mol Synthetase im Filterbindungstest gemessen werden. Danach sollte der Anteil der Leucyl-tRNA-Synthetase an der gesamten Synthetasemenge höchstens 10 % betragen, was mit den Ergebnissen der Aminoacylierungskinetiken in Gegenwart von unfraktionierter tRNA in Einklang steht, wenn man zusätzlich berücksichtigt, daß die Leucyl-tRNA-Synthetase etwa die gleiche spezifische Aktivi-

tät wie die SRS besitzt (73). Wurde der gleiche Aktivierungsansatz im quenched-flow-Apparat mit $tRNA^{Ser}$ gemischt, so wurde im zugänglichen Zeitbereich bis 35o ms kein Transfer von Leucin auf $tRNA^{Ser}$ beobachtet. $tRNA^{Ser}$ wird also nicht nur unter Fließgleichgewichtsbedingungen nicht mit Leucin beladen, sondern auch in der Anlaufphase der Aminoacylierung nach vorausgegangener Aktivierung von Leucin. Ein Korrekturmechanismus, der wie bei anderen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (55, 56, 76) eine stabile Beladung der zugehörigen tRNA mit einer fehlaktivierten Aminosäure durch eine auf den Transfer folgende rasche Deacylierung der misaminoacylierten tRNA verhindert, existiert demnach bei der SRS zumindest für Leucin nicht. Schließlich wurde in Aminoacylierungsexperimenten (5 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$, 21 µM $tRNA^{Ser}$ und 5 - 25o µM [^{14}C]-Serin) bei Zusatz von unmarkiertem Leucin (9,4 mM) keine Hemmung der Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$ gefunden. Selbst bei einem tausendfachen Überschuß von Leucin tritt eine Kompetition mit Serin um die Aminosäure-Bindungsstelle auf der SRS offenbar nicht auf. Alle Befunde sprechen also dafür, daß der Einbau von radioaktivem Pyrophosphat in ATP bei Anwesenheit von Leucin allein auf die Gegenwart der Leucyl-tRNA-Synthetase, nicht aber auf eine Fehlaktivierung von Leucin durch die SRS zurückzuführen ist.

Läßt sich der beobachtete PP_i-ATP-Austausch in Gegenwart von Valin und α-Aminobuttersäure in gleicher Weise erklären? Gegen eine Verunreinigung des Synthetase-Präparates auch mit Valyl-tRNA-Synthetase sprechen drei Argumente: (i) Unfraktionierte tRNA konnte nicht mit Valin beladen werden. (ii) Im Filterbindungstest ließ sich mit Valin kein aktivierter Komplex nachweisen. (iii) Das Valin-spezifische Enzym aus Hefe katalysiert einen PP_i-ATP-Austausch außer mit Valin

auch mit Alanin, Cystein, Threonin, α-Aminobuttersäure und Homoserin (77), während in den eigenen Versuchen mit Cystein, Alanin und Homoserin kein Einbau von radioaktivem Pyrophospat in ATP gemessen wurde. Liegt also eine echte Fehlaktivierung von Valin und α-Aminobuttersäure durch die SRS vor? Zwei experimentelle Befunde stehen dieser Annahme entgegen. Wie Leucin bewirkten auch Valin (9,4 mM) und α-Aminobuttersäure (9,6 mM) keine Hemmung der Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$ mit Serin (Versuchsbedingungen wie für Leucin beschrieben). Ebenso konnten mit radioaktivem Valin im entsprechenden quenched-flow-Experiment (s. bei Leucin) keine Anzeichen für einen intermediären Transfer von fehlaktiviertem Valin auf $tRNA^{Ser}$ mit nachfolgender rascher Deacylierung der misaminoacylierten tRNA gefunden werden. Dagegen wurde die Aminoacylierung unfraktionierter tRNA mit Leucin (K_M = 16 µM; dieser Wert stimmt mit den Angaben in (74) überein) durch Valin (K_i = 6 mM) und α-Aminobuttersäure (K_i = 8 mM) kompetitiv zu Leucin gehemmt. Außerdem wurde im PP_i-ATP-Austausch für Leucin, Valin und α-Aminobuttersäure gleichermaßen eine Abnahme der Austauschgeschwindigkeit um einen Faktor 2,5 relativ zur Reaktionsgeschwindigkeit in Gegenwart von Serin gemessen, wenn für die Versuche das rechromatographierte Synthetase-Präparat (s.o.) verwendet wurde (Tab. 4.3.). Diese Resultate lassen die Annahme gerechtfertigt erscheinen, daß Valin und α-Aminobuttersäure von der kontaminierenden Leucyl-tRNA-Synthetase gebunden und aktiviert werden können. Für die Leucin-spezifische Synthetase aus Hefe sind keine Daten zur Fehlaktivierung veröffentlicht. Es ist jedoch bekannt (75), daß die Leucyl-tRNA-Synthetase aus E.coli in einer Enzymform auftreten kann, in der sie den Pyrophosphataustausch mit Valin und mit anderen Aminosäuren nicht wesentlich langsamer als mit Leucin katalysiert, die fremden Aminosäuren aber nicht auf un-

fraktionierte E.coli-tRNA überträgt. Faßt man all dies zusammen, so ergeben sich starke Evidenzen dafür, daß der PP_i-ATP-Austausch in Gegenwart von Valin und α-Aminobuttersäure nicht durch die SRS katalysiert wird, sondern durch die als Verunreinigung vorhandene Leucyl-tRNA-Synthetase.

Offen bleibt somit nur die Frage, warum in Gegenwart von Threonin ein Pyrophosphataustausch stattfindet. Da die Geschwindigkeit des Austauschs mit Threonin sehr niedrig war im Vergleich zur Reaktionsgeschwindigkeit in Anwesenheit von Serin (Tab. 4.3.), fällt es schwer, verschiedene Erklärungsmöglichkeiten auszuschließen. So könnte die beobachtete Austauschaktivität auf eine geringfügige Kontamination der verwendeten Threoninlösung mit Serin zurückzuführen sein. Papierchromatographisch ließ sich eine solche Verunreinigung nicht mit Sicherheit ausschließen (s.o.). Andererseits verringerte sich die Austauschgeschwindigkeit in Gegenwart von Threonin relativ zu derjenigen mit Serin, wenn für die Experimente die rechromatographierte Synthetase eingesetzt wurde (Tab. 4.3.). Die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit Threonin war jedoch weniger ausgeprägt als mit Leucin, Valin oder α-Aminobuttersäure. Es ist also auch möglich, daß ein Teil der gemessenen Austauschaktivität aus einer langsamen Aktivierung von Threonin durch die Leucyl-tRNA-Synthetase resultiert. In Filterbindungsversuchen mit radioaktivem Threonin wurde in Gegenwart von Pyrophosphatase und nach längeren Inkubationszeiten eine 1 : 1-Stöchiometrie zwischen aktivierter Aminosäure und Synthetase gemessen. Da für radioaktives Threonin eine Verunreinigung mit Serin sicher nachgewiesen werden konnte (s.o.), handelt es sich dabei wohl um aktiviertes Serin, nicht aber um eine Fehlaktivierung von Threonin. In Aminoacylierungsexperimenten, in denen radioaktives Serin in Konzentrationen von 2 bis 25o µM ein-

gesetzt wurde, bewirkte die Zugabe von unmarkiertem Threonin (12 mM) keine Hemmung der Beladung von $tRNA^{Ser}$ mit Serin. Auch bei hohem Überschuß von Threonin über Serin findet also keine Kompetition zwischen beiden Aminosäuren um die Bindungsstelle auf der Synthetase statt. Wenn sich auch eine Fehlaktivierung von Threonin durch die SRS nicht mit Sicherheit ausschließen läßt, so zeigt dieses Ergebnis doch, daß Threonin, wenn überhaupt, allenfalls mit sehr niedriger Affinität an die Synthetase binden kann.

Alle anderen Aminosäuren, die in den PP_i-ATP-Austauschversuchen keinen Einbau von radioaktivem Pyrophosphat in ATP ermöglicht hatten, wurden zur Kontrolle ebenfalls im Aminoacylierungsexperiment auf ihre inhibitorische Wirkung getestet. Wie zu erwarten war, wurde in keinem Fall eine Hemmung der Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$ mit Serin beobachtet. Ebenso ergaben weitere quenched-flow-Transferexperimente mit radioaktivem Glycin, Alanin und Aspartat keine Anzeichen dafür, daß diese Aminosäuren aktiviert und intermediär auf $tRNA^{Ser}$ übertragen werden können.

Alle Ergebnisse weisen also darauf hin, daß die hohe Aminosäure-Spezifität der Seryl-tRNA-Synthetase, die bei der Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$ unter Fließgleichgewichts-Bedingungen gefunden wurde, auf einer Diskriminierung gegen die falsche Aminosäure bereits auf der Stufe der Aminosäure-Bindung durch die Synthetase beruht. Für eine spätere Aminosäure-Selektion durch einen hydrolytischen Korrekturmechanismus, der wie bei anderen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen auf der Stufe der aminoacylierten tRNA eingreift, ließen sich keine Hinweise entdecken.

5. UNTERSUCHUNGEN ZUR KINETIK DER AMINOACYLIERUNG VON $tRNA^{Phe}$ WÄHREND DER ANLAUFPHASE DER REAKTION. LOKALISIERUNG DES GESCHWINDIGKEITSBESTIMMENDEN TEILSCHRITTS IM REAKTIONSMECHANISMUS VON PHENYLALANYL-tRNA-SYNTHETASE

Wie im Falle der SRS konzentrierten sich auch bei der PRS aus Hefe die bisherigen Untersuchungen zur Kinetik von Teilschritten der Aminoacylierung vor allem auf die fluorometrische Analyse der Bindungskinetik der $tRNA^{Phe}$ (33, 38). Zusätzlich war jedoch bei der PRS auch schon ein Versuch unternommen worden, den geschwindigkeitsbegrenzenden Teilschritt der Aminoacylierung zu bestimmen (27). Dazu war mit einem speziellen reaktionskinetischen Verfahren (78) die Geschwindigkeit des Transfers von aktiviertem Phenylalanin auf $tRNA^{Phe}$ mit der Geschwindigkeit der vollständigen Aminoacylierungsreaktion verglichen worden. Die Versuche ergaben, daß der Transferschritt nicht wesentlich schneller als die Gesamtreaktion verläuft. Allerdings mußten die Experimente aus meßtechnischen Gründen bei niedrigem pH-Wert (6,o) und tiefer Temperatur (0^{o} C) durchgeführt werden, so daß die Möglichkeit offen bleibt, daß unter physiologischen pH- und Temperaturbedingungen ein anderer Teilschritt der Aminoacylierung geschwindigkeitsbestimmend ist. Um diese Frage zu klären und um einen Vergleich mit den entsprechenden Ergebnissen bei der SRS zu ermöglichen, wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Kinetik der Aminoacylierung von $tRNA^{Phe}$ während der Anlaufphase der Reaktion mit Hilfe der quenched-flow-Technik untersucht.

5.1. Kinetische Analyse des Reaktionsablaufs bei hohen Substratkonzentrationen

In einer Reihe von Vorversuchen wurde analog zu den Experimenten mit SRS (Kap. 3.1.) zunächst die Konzentrationsabhängigkeit der spezifischen Aktivität der PRS bei hohen Enzymkonzentrationen, die Beladbarkeit der $tRNA^{Phe}$ bei hohen tRNA-Konzentrationen und die kinetisch optimale $MgCl_2$-Konzentration bestimmt. Ebenso wie die SRS zeigte auch die PRS bei Variation der Synthetasekonzentration im Bereich von 1×10^{-8} bis 3×10^{-6} M keine signifikanten Änderungen der spezifischen Aktivität. Folglich lassen sich bei der PRS ebenfalls die in den quenched-flow-Kinetiken bestimmten Geschwindigkeitskonstanten direkt mit der bei niedrigeren Enzymkonzentrationen gemessenen Wechselzahl der Synthetase vergleichen. Die Akzeptoraktivität der $tRNA^{Phe}$ betrug 1,4 nMol Phenylalanin/A_{260}-Einheit in verdünnten Lösungen und etwa 1,2 nMol Phenylalanin/A_{260}-Einheit bei der in den quenched-flow-Versuchen verwendeten tRNA-Konzentration von 20 µM, wenn die $tRNA^{Phe}$ wie unter Abb. 3.3. beschrieben behandelt wurde. Die Messungen zur Mg^{2+}-Abhängigkeit der Aminoacylierung schließlich ergaben Resultate, die mit den in (23, 79) veröffentlichten Angaben übereinstimmen. Alle im folgenden beschriebenen Versuche wurden bei der jeweils kinetisch optimalen $MgCl_2$-Konzentration durchgeführt.

Die kinetische Analyse des Reaktionsablaufs an PRS erfolgte nach dem gleichen experimentellen Schema wie bei SRS. In einer ersten Serie von quenched-flow-Experimenten wurde die Synthetase mit einer Lösung von ATP, Phenylalanin und $tRNA^{Phe}$ rasch gemischt und die Zeitkurve der Bildung von Phenylalanyl-$tRNA^{Phe}$ ermittelt (Abb. 5.1.). Die Messungen ergaben einen praktisch linearen Anstieg der Konzentration an bela-

dener $tRNA^{Phe}$ mit der Zeit, die Steigung entsprach der Geschwindigkeit der Aminoacylierung unter Fließgleichgewichtsbedingungen (etwa 9 s^{-1}). Eine meßbare Induktionsphase zu Beginn der Reaktion trat nicht auf. Dieser Befund zeigt, daß die Aktivierung von Phenylalanin unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen nicht geschwindigkeitsbestimmend für die Aminoacylierung der $tRNA^{Phe}$ ist. Die quantitative Auswertung der gemessenen Zeitkurve mit Hilfe des in Kap. 3.2.2. beschriebenen Reaktionsmodells ergab unter der Voraussetzung, daß die Reaktionsamplitude 95 % beträgt (d.h. 95 % der Synthetasemoleküle katalytisch aktiv sind), für die Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 Werte von 85 $\pm$ 15 s^{-1} und 16 $\pm$ 4 s^{-1}. Der schnellere Prozeß läßt sich im wesentlichen der Aktivierung von Phenylalanin zuordnen, da PP_i-ATP-Austauschexperimente unter vergleichbaren Bedingungen und in Gegenwart von $tRNA^{Phe}$ gezeigt hatten, daß der Teilprozeß der Aktivierung von Phenylalanin um eine Größenordnung schneller abläuft als der gesamte Reaktionszyklus der Aminoacylierung von $tRNA^{Phe}$ (27). Die Assoziation der niedermolekularen Substrate, die ja als Teilschritt der Aktivierung ebenfalls im Pyrophosphataustausch erfaßt wird, muß somit auch ein schneller Prozeß im Reaktionsmechanismus der PRS sein. Dies wurde durch quenched-flow-Versuche bestätigt, in denen die Synthetase mit ATP oder Phenylalanin präinkubiert und dann mit den komplementären Substraten gemischt wurde. Die gemessenen Zeitkurven der Aminoacylierung (in Abb. 5.1. für den Fall der Präinkubation mit ATP dargestellt) zeigten keinen Unterschied zu der Reaktion ohne Substratpräinkubation der Synthetase. Der geschwindigkeitslimitierende Teilprozeß der Aminoacylierung von $tRNA^{Phe}$, der durch die Geschwindigkeitskonstante k_2 beschrieben wird, muß daher auf einer späteren, auf die Aminosäure-Aktivierung folgenden Teilstrecke des Reaktionsmechanismus der PRS lokalisiert sein.

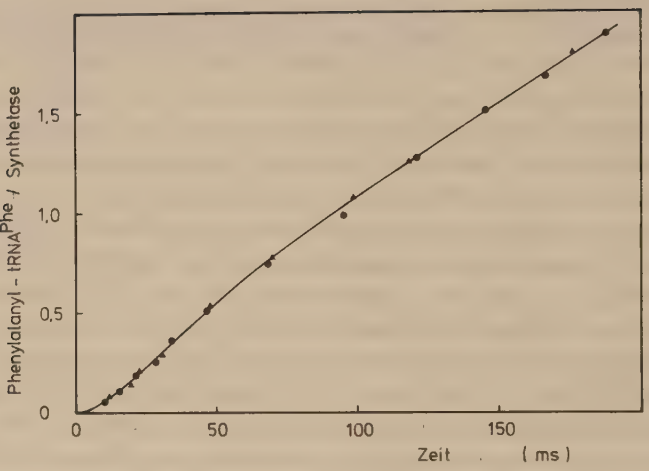


Abb. 5.1.: Zeitkurve der Aminoacylierung von $tRNA^{Phe}$ während der Anlaufphase der Reaktion. 3oo µl PRS (2,5 µM) wurden im quenched-flow-Apparat mit einem gleich großen Volumen einer Lösung von $tRNA^{Phe}$ (4o µM), [^{14}C]-Phenylalanin (1 mM), ATP (1o mM) und $MgCl_2$ (2o mM) gemischt (●). Nach den angegebenen Zeiten wurde die Reaktion mit 5 %iger Trichloressigsäure gestoppt und die Ausbeute an [^{14}C]-Phenylalanyl-$tRNA^{Phe}$ bestimmt. In einem zweiten Experiment wurde PRS (2,5 µM) mit ATP (5 mM) und $MgCl_2$ (1o mM) 1o min bei 21° C präinkubiert und dann im quenched-flow-Apparat mit einer Lösung von $tRNA^{Phe}$ (4o µM), [^{14}C]-Phenylalanin (1 mM), ATP (5 mM) und $MgCl_2$ (1o mM) gemischt (▲).

Um die Kinetik des Transfers von aktiviertem Phenylalanin auf $tRNA^{Phe}$ zu bestimmen, wurde die Synthetase mit ATP und Phenylalanin präinkubiert und dann im quenched-flow-Apparat mit $tRNA^{Phe}$ gemischt. Die Geschwindigkeit der Synthese von Phenylalanyl-$tRNA^{Phe}$ war in der Anlaufphase der Reaktion nur wenig schneller als im nachfolgenden quasi-stationären Zustand der Aminoacylierung (Abb. 5.2.). Aus diesem Befund läßt sich ableiten, daß unter den vorliegenden Bedingungen der Transferschritt geschwindigkeitsbestimmend für die Aminoacylierung von $tRNA^{Phe}$ ist. Die quantitative Auswertung (Kap. 3.2.4.) der gemessenen Zeitkurve erbrachte keine eindeutigen Resultate, da aufgrund des uncharakteristischen Kurvenverlaufs eine getrennte Bestimmung von Transferamplitude und -Geschwindigkeitskonstante nicht möglich war. Deshalb wurde das Transferexperiment wiederholt, wobei jedoch im quenched-flow-Apparat zusammen mit der $tRNA^{Phe}$ ein Überschuß an unmarkiertem Phenylalanin zugegeben wurde, um die Messung der tRNA-Beladung im Fließgleichgewicht zu unterdrücken. Unter diesen Bedingungen wurde nur der exponentielle Anstieg der Konzentration an Phenylalanyl-$tRNA^{Phe}$ während des ersten Reaktionszyklus beobachtet (Abb. 5.2.). Die Auswertung der Zeitkurve ergab eine Amplitude von $1{,}2 \pm 0{,}1$ Mol transferiertem Phenylalanin pro Mol Synthetase und eine Geschwindigkeitskonstante von $16 \pm 2\ s^{-1}$. Offenbar kann unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen (hohe Aminosäure- und ATP-Konzentration) auch in Abwesenheit von Pyrophosphatase mehr als ein Phenylalanin pro Synthetase aktiviert und auf $tRNA^{Phe}$ transferiert werden. Aufgrund der begrenzten Meßgenauigkeit läßt sich nicht ausschließen, daß der Transfer biphasisch ist, d.h. daß sich die Geschwindigkeitskonstante für die Übertragung des zweiten Phenylalanin-Moleküls von der des ersten unterscheidet. Allerdings kann man durch Kurvenanpassungen unter Variation der Amplitudenwerte für ersten

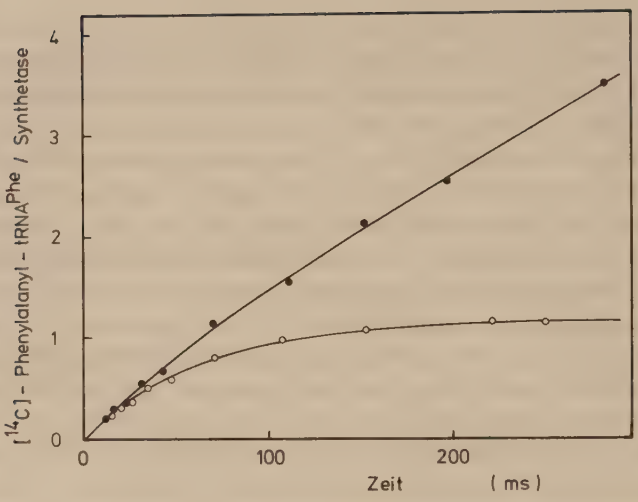


Abb. 5.2.: Zeitkurven der Aminoacylierung von $tRNA^{Phe}$ nach vorausgegangener Aktivierung der Aminosäure. PRS (2,5 µM) wurde mit ATP (5 mM), $MgCl_2$ (1o mM) und [^{14}C]-Phenylalanin (o,5 mM) präinkubiert und dann im quenched-flow-Apparat mit einer Lösung von $tRNA^{Phe}$ (4o µM), ATP (5 mM), $MgCl_2$ (1o mM) und [^{14}C] -Phenylalanin (o,5 mM) gemischt (●). In einem weiteren Experiment wurde der gleiche Präinkubationsansatz im quenched-flow-Apparat mit einer Lösung gemischt, die neben $tRNA^{Phe}$ (4o µM), ATP (5 mM) und $MgCl_2$ (1o mM) unmarkiertes Phenylalanin (1o mM) enthielt (o).

und zweiten Transfer abschätzen, daß der Unterschied zwischen den Geschwindigkeitskonstanten, wenn er überhaupt besteht, nicht sehr groß sein kann. Unabhängig von der Frage

nach den einzelnen Geschwindigkeitskonstanten und Amplituden zeigen die quenched-flow-Versuche aber, daß die Synthese von Phenylalanyl-$tRNA^{Phe}$, ausgehend vom aktivierten Komplex mit einer Geschwindigkeit erfolgt, die sich nur geringfügig von der Geschwindigkeit der Aminoacylierung unter Fließgleichgewichtsbedingungen (ca. 9 s^{-1}) unterscheidet. Qualitativ und quantitativ vergleichbare quenched-flow-kinetische Resultate wurden nach Abschluß der eigenen Untersuchungen an PRS von einer anderen Arbeitsgruppe veröffentlicht (8o).

Im Falle der SRS entspricht die reaktionskinetisch ermittelte Geschwindigkeitskonstante des Transfers, zumindest bei hohen Serinkonzentrationen, der in Relaxationskinetiken fluorimetrisch bestimmten Geschwindigkeitskonstanten für die Umlagerung des Synthetase-tRNA-Komplexes, die im Anschluß an die Assoziation der $tRNA^{Ser}$ erfolgt. Ist in analoger Weise auch die Bindung der $tRNA^{Phe}$ und die nachfolgende Umlagerung des PRS-$tRNA^{Phe}$-Komplexes geschwindigkeitslimitierend für die von der PRS katalysierte Transferreaktion? Die Antwort auf diese Frage fällt etwas differenzierter aus. So zeigten quenched-flow-Versuche, in denen die Zeitkurve der Aminoacylierung von $tRNA^{Phe}$, ausgehend von der freien Synthetase bzw. vom PRS-$tRNA^{Phe}$-Komplex bestimmt wurde, keinen signifikanten Unterschied in der Kinetik der Aminoacylierung während der Anlaufphase der Reaktion. Demzufolge kann die Bindung zwischen $tRNA^{Phe}$ und PRS einschließlich der Konformationsänderung des Komplexes kein langsamer Prozeß im Reaktionsmechanismus der Synthetase sein. Dieser Befund stimmt mit Ergebnissen überein, die aus relaxationskinetischen Fluoreszenzstudien zur Bindung von $tRNA^{Phe}$ an PRS in Abwesenheit der anderen Substrate gewonnen worden waren (33). Diesen Versuchen zufolge läuft der gesamte Prozeß der $tRNA^{Phe}$-Bindung um etwa zwei Größenordnungen schneller ab

als die Aminoacylierung. Mit der gleichen Technik konnte jedoch vor kurzem auch gezeigt werden, daß die Bindung zwischen $tRNA^{Phe}$ und PRS in Gegenwart von Phenylalaninyl-Adenylat, einem nicht-reaktiven Analog des Phenylalanyl-Adenylats, drastisch verlangsamt ist (81). Unter diesen Bedingungen wurde für die auf die tRNA-Assoziation folgende Komplexumwandlung eine Geschwindigkeitskonstante von $1o\ s^{-1}$ gemessen. Zusammen mit anderen Befunden (82, 83) legt dieses Ergebnis die Schlußfolgerung nahe, daß die Assoziation von $tRNA^{Phe}$ und PRS eine Kaskade von Konformationsänderungen des Komplexes auslöst, von denen ein Teil schnell abläuft, ein anderer Teil dagegen langsam und erst, nachdem die Aktivierung des Phenylalanins stattgefunden hat. Aus der weitgehenden Übereinstimmung der relaxationskinetisch bzw. reaktionskinetisch ermittelten Geschwindigkeitskonstanten ($1o\ s^{-1}$ bzw. $16\ s^{-1}$) geht hervor, daß die Geschwindigkeit des Transfers von aktiviertem Phenylalanin auf $tRNA^{Phe}$ durch die langsame(n) Konformationsänderung(en) des PRS·Phe-AMP·$tRNA^{Phe}$-Komplexes limitiert wird.

Da die Zeitkurve der Aminoacylierung ohne vorausgegangene Substratpräinkubation der Synthetase keinen raschen Anstieg der Konzentration an Phenylalanyl-$tRNA^{Phe}$ während der Anlaufphase der Reaktion gezeigt hatte, ist die Möglichkeit auszuschließen, daß die Dissoziation der beladenen $tRNA^{Phe}$ langsam ist und die Geschwindigkeit der Aminoacylierung von $tRNA^{Phe}$ merklich beeinflußt. Die quenched-flow-Experimente bestätigen somit auch frühere stopped-flow-kinetische Untersuchungen bei niedrigen Temperaturen, die für die Dissoziation der Phenylalanyl-$tRNA^{Phe}$ eine Geschwindigkeitskonstante von $4o\ s^{-1}$ ergeben hatten (38).

5.2. Untersuchungen zur Lokalisation des geschwindigkeitslimitierenden Schrittes der Aminoacylierung von $tRNA^{Phe}$ bei niedrigen Substratkonzentrationen

Die bisher beschriebenen Untersuchungen zur Kinetik der Aminoacylierung von $tRNA^{Phe}$ während der Anlaufphase der Reaktion waren bei weitgehender Substratsättigung der PRS durchgeführt worden. Die Frage, ob bei niedrigen ATP- und Aminosäurekonzentrationen möglicherweise ein anderer Teilschritt als der Transfer geschwindigkeitslimitierend für die Gesamtreaktion werden kann, mußte daher offen bleiben. Um diese Frage zu beantworten, wurden die quenched-flow-Experimente unter entsprechenden Konzentrationsbedingungen wiederholt (Abb. 5.3.). Die Auswertung des Transferexperiments ergab, daß in Gegenwart von 5o µM Phenylalanin und loo µM ATP etwa o,75 Mol Phenylalanin pro Mol Synthetase mit einer unveränderten Geschwindigkeitskonstante von 16 $\pm$ 2 s^{-1} auf $tRNA^{Phe}$ übertragen wurden. Offensichtlich ist also die Geschwindigkeitskonstante des Transfers über einen größeren Konzentrationsbereich unabhängig von der ATP- und Aminosäurekonzentration. Die Wechselzahl der PRS betrug unter den in Abb. 5.3. beschriebenen Konzentrationsbedingungen etwa o,8 s^{-1}. Da die Geschwindigkeit des Transfers nun gegenüber der Aminoacylierungsgeschwindigkeit um eine Größenordnung höher ist, muß folglich bei niedrigen Konzentrationen an ATP und Phenylalanin ein anderer Schritt geschwindigkeitsbegrenzend sein. Um diesen Schritt zu lokalisieren, wurde in einem zweiten quenched-flow-Experiment unter den gleichen Konzentrationsbedingungen die Zeitkurve der Aminoacylierung ausgehend von der freien Synthetase gemessen (Abb. 5.3.). In diesem Versuch wurden, im Gegensatz zu dem gleichen Experiment bei hoher ATP- und Aminosäurekonzentration, meßbare Mengen an Phenylalanyl-$tRNA^{Phe}$ erst nach einer Induktionsphase von

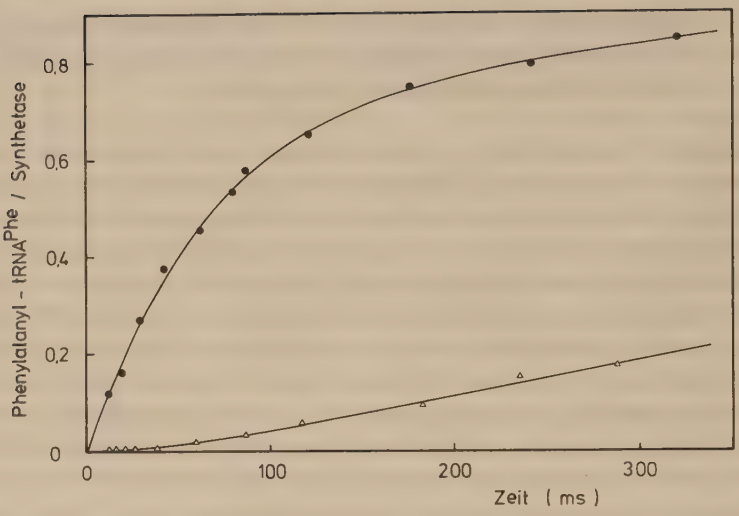


Abb. 5.3.: Zeitkurven der Aminoacylierung von $tRNA^{Phe}$ bei niedriger ATP- und Phenylalaninkonzentration. (△) Ohne Präinkubation der Synthetase mit Substraten: PRS (2,5 µM) wurde im quenched-flow-Apparat mit einer Lösung von ATP (2oo µM), $MgCl_2$ (1o mM), [^{14}C]-Phenylalanin (1oo µM) und $tRNA^{Phe}$ (4o µM) gemischt. (●) Nach vorausgegangener Aktivierung von Phenylalanin: PRS (2,5 µM) wurde mit ATP (1oo µM), $MgCl_2$ (5 mM) und [^{14}C]-Phenylalanin (5o µM) präinkubiert und dann im quenched-flow-Apparat mit einer Lösung von ATP (1oo µM), $MgCl_2$ (5 mM), [^{14}C]-Phenylalanin (5o µM) und $tRNA^{Phe}$ (4o µM) gemischt.

ca. 3o ms Dauer beobachtet. Die quantitative Auswertung der Zeitkurve ergab für die Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 Werte von $1 \pm 0{,}1\ s^{-1}$ und $16 \pm 2\ s^{-1}$, wobei für die Reaktionsamplitude der im Transferexperiment gemessene Wert von 75 % der Synthetasekonzentration eingesetzt wurde. Die Tatsache, daß der Synthese von Phenylalanyl-$tRNA^{Phe}$ eine längere Induktionsphase vorausgeht, zeigt zweierlei an: (i) Auch bei niedrigen Konzentrationen von ATP und Phenylalanin erfolgt die Dissoziation der beladenen $tRNA^{Phe}$ schnell im Vergleich zur Geschwindigkeit der gesamten Aminoacylierung; (ii) langsam und damit limitierend für die Geschwindigkeit der Aminoacylierung ist ein Teilschritt im Reaktionsmechanismus der PRS, der vor dem Transfer liegt. Geht man von einer diffusionskontrollierten Assoziationsgeschwindigkeit für ATP und Phenylalanin aus, so kann die Bindung der niedermolekularen Substrate an die Synthetase bei den vorliegenden Konzentrationen nicht langsam sein. Somit ergibt sich die Schlußfolgerung, daß eine Konformationsänderung des Enzym-Substrat-Komplexes, die Aktivierung von Phenylalanin selbst oder eine auf die Aktivierung folgende Umlagerung des aktivierten Komplexes geschwindigkeitslimitierend für die Aminoacylierung von $tRNA^{Phe}$ bei niedrigen ATP- und Phenylalanin-Konzentrationen ist.

6. DISKUSSION

6.1. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Reaktionsmechanismus von Seryl- und Phenylalanyl-tRNA-Synthetase. Vergleich mit anderen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen

Die Aktivierung von Serin ist der geschwindigkeitsbestimmende Teilschritt der Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$. Den beschriebenen Versuchsergebnissen zufolge gilt diese Feststellung sowohl für die Aminoacylierung unter Konzentrationsbedingungen, die zu einer weitgehenden Absättigung der starken Substratbindungsstellen der Synthetase führen, als auch bei relativ niedrigen Substratkonzentrationen. Offen bleiben mußte die Frage, ob der langsame Prozeß bei der Aktivierung von Serin die chemische Reaktion selbst ist oder eine der Reaktion vorausgehende Konformationsänderung des Enzym-Substrat-Komplexes. Natürlich ließe sich z. B. die Beobachtung, daß die Geschwindigkeit der Aktivierung bei Anwesenheit von $tRNA^{Ser}$ verringert ist, sehr anschaulich mit einer sterischen Behinderung einer Konformationsumwandlung der Synthetase durch die gebundene $tRNA^{Ser}$ erklären. Eindeutige experimentelle Beweise für eine solche konformationelle Umlagerung der SRS während der Aktivierungsreaktion existieren aber nicht. Zwar haben frühere fluorimetrische Untersuchungen ergeben, daß die Tryptophan-Fluoreszenz der Synthetase unter Aktivierungsbedingungen einen leichten Intensitätsanstieg zeigt (13). Wegen der nur geringfügigen Änderung des Intensitätssignals läßt sich jedoch nicht ausschließen, daß es sich dabei lediglich um eine lokale Beeinflussung eines einzelnen Tryptophan-Restes in Nachbarschaft des aktiven Zentrums der SRS handelt. Die geringe Signalgröße hat bis-

lang auch fluorimetrische Messungen zur Kinetik der Aktivierung verhindert. Offensichtlich sind andere experimentelle Techniken nötig, um die Frage nach der chemischen oder physikalischen Natur des langsamen Prozesses bei der Aktivierung von Serin zu klären.

Im Reaktionsmechanismus der PRS ist bei hohen Substratkonzentrationen der Transfer von aktiviertem Phenylalanin auf $tRNA^{Phe}$ der geschwindigkeitslimitierende Schritt der Aminoacylierung. Hier läßt sich anhand eines Vergleichs zwischen der gemessenen Geschwindigkeitskonstante des Transfers und relaxationskinetisch ermittelten Daten der tRNA-Bindung (81) zeigen, daß eine Konformationsänderung des ternären Komplexes aus Synthetase, aktivierter Aminosäure und $tRNA^{Phe}$ der langsame Prozeß innerhalb der Transferreaktion ist. Die Existenz verschiedener Konformationszustände von $tRNA^{Phe}$ in Lösung ist seit langem postuliert worden (84). Mit Farbstoff-markierter $tRNA^{Phe}$ konnten mehrere tRNA-Konformere inzwischen nachgewiesen werden (85). Nach den in (85) angegebenen Daten läßt sich ein langsamer Übergang zwischen zwei bestimmten Konformationszuständen der $tRNA^{Phe}$ mit dem Transferschritt zeitlich korrelieren. Es gibt jedoch auch Hinweise auf eine Konformationsänderung der Synthetase während der Umlagerung des ternären Komplexes (82, 86). Möglicherweise handelt es sich also bei diesem Schritt um eine gegenseitige Feinanpassung von PRS und $tRNA^{Phe}$, die erst den Transfer des aktivierten Phenylalanins auf den 3'-terminalen Adenosinrest der tRNA ermöglicht.

Die quenched-flow-Experimente mit PRS bei niedrigen Konzentrationen an ATP und Phenylalanin haben gezeigt, daß unter diesen Bedingungen nicht mehr der Transferschritt geschwindigkeitsbestimmend für die Aminoacylierung von $tRNA^{Phe}$ ist,

sondern ein dem Transfer vorgelagerter Prozeß. Ob es sich dabei um die Aktivierung von Phenylalanin selbst handelt oder um eine der Aktivierungsreaktion vorausgehende oder nachfolgende Konformationsänderung der Synthetase, kann nicht entschieden werden. Die Ursache für den von der ATP- und Phenylalanin-Konzentration abhängigen Wechsel im geschwindigkeitslimitierenden Schritt wird später noch diskutiert.

In den letzten Jahren wurden von der Arbeitsgruppe um A. Fersht eine Reihe von Ergebnissen aus quenched-flow-kinetischen Untersuchungen an verschiedenen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen veröffentlicht. In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß bei der Mehrzahl der untersuchten Synthetasen der Transfer von aktivierter Aminosäure auf die tRNA langsam abläuft und geschwindigkeitslimitierend für die Aminoacylierungsreaktion ist (Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus E.coli (54), Methionyl-tRNA-Synthetase aus B.stearothermophilus (87) und, übereinstimmend mit den eigenen Resultaten bei hohen Substratkonzentrationen, Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus Hefe (8o)); in einem Fall wurde die Dissoziation der beladenen tRNA als geschwindigkeitsbestimmender Schritt identifiziert (Arginyl-tRNA-Synthetase aus Hefe (88)); für eine weitere Synthetase (Tyrosyl-tRNA-Synthetase aus E.coli (53, 54)) schließlich wurde berichtet, daß Aktivierung und Transfer etwa gleich langsam ablaufen und somit gemeinsam zur Begrenzung der Aminoacylierungsgeschwindigkeit beitragen. U. Lagerkvist und Mitarbeiter veröffentlichten ebenfalls Resultate von quenched-flow-kinetischen Messungen an verschiedenen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (58). Aus den angegebenen Zeitkurven der Aminoacylierung nach unterschiedlicher Substratpräinkubation der Synthetase läßt sich ableiten, daß im Falle der Phenylalanyl-tRNA-Synthetase aus E.coli Aktivie-

rung und Transfer gleichermaßen zur Begrenzung der Reaktionsgeschwindigkeit beitragen; für die anderen verwendeten Synthetasen ist eine eindeutige Identifizierung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes aufgrund der angegebenen experimentellen Daten nicht möglich.

Wie dieser Vergleich zeigt, gibt es bei den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen hinsichtlich der Lokalisation des geschwindigkeitslimitierenden Schrittes im Mechanismus der Aminoacylierung ein breites Spektrum an Möglichkeiten. Bei der Mehrzahl der untersuchten Synthetasen liegt dieser Schritt in der Transferreaktion und ist somit ein Bestandteil der komplizierten Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkung zwischen dem Enzym und seinem makromolekularen Substrat tRNA. Weitaus weniger häufig, als dies frühere Untersuchungen (78, 89, 90) zunächst hatten vermuten lassen, ist die Dissoziation der beladenen tRNA, letztlich also auch ein Spezialfall der Synthetase-tRNA-Wechselwirkung, geschwindigkeitslimitierend für die Aminoacylierungsreaktion. Die bei der SRS gefundene Situation, daß die Aktivierung, d. h. die Wechselwirkung der Synthetase mit ihren niedermolekularen Substraten, auch bei hohen Substratkonzentrationen der langsamste Schritt im Mechanismus der Aminoacylierung ist, stellt offenbar eher eine Ausnahme dar.

6.2. Kinetik einzelner Teilschritte im Reaktionsmechanismus von Seryl-tRNA-Synthetase

Bei Substratkonzentrationen, die zu einer Sättigung der starken Bindungsstellen auf der Synthetase führen, und bei optimaler Konzentration an Mg^{2+}-Ionen zeigt die SRS im quasi-stationären Zustand der Aminoacylierung eine Wech-

selzahl von 1,1 s^{-1}. Der langsamste Teilschritt im Reaktionsmechanismus der SRS, die Aktivierung von Serin, läuft unter diesen Bedingungen mit einer Geschwindigkeit von ca. 1,2 s^{-1} ab. (Mit diesem Wert sind allerdings auch die Geschwindigkeiten der nachfolgenden Teilreaktionen bis zur Bildung der Seryl-$tRNA^{Ser}$ erfaßt, weil die quantitative Auswertung der reaktionskinetischen Messungen mit dem einfachen 2-Schritt-Reaktionsmodell eine weitere Differenzierung zwischen den Teilschritten der Aminoacylierung nicht zuließ. Da jedoch der Transfer mindestens um den Faktor 3o schneller ist als die Aktivierung, dürfte die tatsächliche Geschwindigkeit der Aktivierungsreaktion nicht wesentlich von dem angegebenen Zahlenwert abweichen.)

Mit einer Geschwindigkeit von etwa 12 s^{-1} laufen in Gegenwart hoher Substratkonzentrationen Prozesse ab, die mit der Bindung der Substrate an die Synthetase in Zusammenhang stehen. Durch die quenched-flow-Versuche nach unterschiedlicher Präinkubation der SRS mit Substraten konnte die Geschwindigkeit einzelner Prozesse separat bestimmt werden. Der langsamste Schritt ist mit der Assoziation von ATP verbunden, seine Geschwindigkeit beträgt etwa 17 s^{-1}. Die mit der Bindung von Serin und $tRNA^{Ser}$ korrelierten Vorgänge laufen dagegen schneller, mit einer Geschwindigkeit von etwa 45 s^{-1}, ab. Im Zusammenhang mit diesen kinetisch nachgewiesenen Prozessen stehen zwei Fragen zur Diskussion: (i) Handelt es sich dabei um langsame bimolekulare Assoziationsschritte oder um monomolekulare Umlagerungen der Synthetase-Substrat-Komplexe, und (ii) sind diese Vorgänge spezifisch für die in den quenched-flow-Experimenten untersuchte Anlaufphase der Aminoacylierung oder kommen sie auch im Reaktionsmechanismus der SRS unter Fließgleichgewichtsbedingungen vor?

Auf die erste Frage läßt sich zumindest hinsichtlich des mit der tRNA-Bindung korrelierten Prozesses eine eindeutige Antwort geben. Hier hatten frühere fluorimetrische Untersuchungen gezeigt, daß im Anschluß an die schnelle, lediglich diffusionskontrollierte Rekombination von $tRNA^{Ser}$ und SRS eine langsame, mit einer Geschwindigkeitskonstante von 5o s^{-1} ablaufende Umlagerung des Synthetase-tRNA-Komplexes stattfindet (lo). Im Falle der anderen Prozesse, die mit der Bindung der niedermolekularen Substrate an die Synthetase zusammenhängen, gibt es zwar keine direkten experimentellen Beweise dafür, daß es sich ebenfalls um Konformationsänderungen der entsprechenden Enzym-Substrat-Komplexe handelt. Einige Befunde sprechen aber für die Richtigkeit dieser Annahme. So ist die Geschwindigkeitskonstante des mit der ATP-Bindung korrelierten Prozesses, nach entsprechenden quenched-flow-Experimenten zu urteilen, unabhängig von der ATP-Konzentration. Schon zu Beginn der SRS-Forschung konnte gezeigt werden, daß die Synthetase im Komplex mit ATP und $MgCl_2$ sehr wirksam gegen Hitzeinaktivierung geschützt ist (91). Schließlich geht auch die Bindung von ATP an die SRS mit einer Intensitätsabnahme der Tryptophan-Fluoreszenz der Synthetase einher (8, 13). Allerdings ist, analog zu der Situation bei der Aktivierungsreaktion (s. o.), die Veränderung des Fluoreszenzsignals nur sehr klein, so daß eindeutige Aussagen zur Kinetik der ATP-Bindung bisher nicht möglich waren. Es gibt aber indirekte stopped-flow-kinetische Hinweise darauf, daß die Assoziation von ATP eine langsame Konformationsänderung der Synthetase auslöst (37). Experimentelle Belege für eine durch die Assoziation von Serin induzierte Umlagerung der SRS wurden bisher nicht gefunden. So tritt beispielsweise bei Titration der Synthetase mit Serin keine Intensitätsänderung der Tryptophan-Fluoreszenz auf (13). Dennoch erscheint es sinnvoll, auch eine relativ langsame Konformati-

onsänderung des SRS-Serin-Komplexes zu postulieren, da andederenfalls aufgrund der quenched-flow-Daten angenommen werden muß, daß die bimolekulare Assoziation von SRS und Serin etwa um einen Faktor 10^4 langsamer abläuft als ein diffusionskontrollierter Assoziationsprozeß zwischen entsprechend großen Molekülen.

Die Frage nach der Relevanz dieser Prozesse für den Reaktionsmechanismus der Synthetase im quasi-stationären Zustand läßt sich gleichfalls nur mit Einschränkungen beantworten. Mit einer Geschwindigkeitskonstante von 12 s^{-1} für die Gesamtheit der mit der Substratbindung verknüpften Prozesse sind diese Vorgänge wohl schnell genug, um zusätzlich zu dem langsamen Aktivierungsschritt (1,2 s^{-1}) im Reaktionszyklus der Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$ unter Fließgleichgewichtsbedingungen (1,1 s^{-1}) enthalten sein zu können. Aufgrund der Ergebnisse der Transferexperimente, die im folgenden noch eingehend diskutiert werden, erscheint die Aussage gesichert, daß die auf die tRNA-Assoziation folgende Umlagerung des SRS-$tRNA^{Ser}$-Komplexes ein essentieller Teilschritt des Aminoacylierungsmechanismus unter Fließgleichgewichtsbedingungen ist. Weniger klar ist die Situation jedoch hinsichtlich der Prozesse, die mit der Bindung der niedermolekularen Substrate an die Synthetase verknüpft sind. Zwar haben die quenched-flow-Versuche Hinweise darauf erbracht, daß zumindest der langsame Vorgang bei der ATP-Assoziation nicht nur an der freien Synthetase abläuft, sondern auch an den Enzymkomplexen mit Serin, $tRNA^{Ser}$ oder beiden Substraten gemeinsam. Es ist aber ungewiß, ob ATP im quasi-stationären Zustand der Aminoacylierung tatsächlich an eine der aufgeführten Enzymformen bindet oder ob die Assoziation von ATP an einem Synthetasekomplex stattfindet, der auch Produkte der Aminoacylierungsreaktion gebunden enthält. Somit ist nicht

auszuschließen, daß die Kinetik der Bindung von ATP oder Serin unter Fließgleichgewichtsbedingungen anders ist als im ersten Zyklus der Reaktion. Um hier zu einer klaren Entscheidung zu kommen, sind weitere Experimente nötig. Eine Voraussetzung für aussagekräftige quenched-flow-Versuche, die der Situation im quasi-stationären Zustand der Aminoacylierung besser angepaßt sind, ist auch eine detaillierte Kenntnis der Synthetasekomplexe, die in die Reaktion unter Fließgleichgewichtsbedingungen involviert sind. Im Falle der SRS gibt es eine Reihe von Untersuchungen zu diesem Fragenkomplex (72), ein vollständiges Reaktionsschema, das neben der Reihenfolge der Substrat-Assoziationen und Produkt-Dissoziationen auch die Zusammensetzung der beteiligten Enzymkomplexe angibt, konnte aber bislang nicht aufgestellt werden.

Der Transfer von aktiviertem Serin auf $tRNA^{Ser}$ ist schnell im Vergleich zu den langsamen Vorgängen bei der Substrat-Bindung und bei der Aktivierung von Serin. Die Auswertung der quenched-flow-Experimente, die unter normalen Konzentrationen an Substraten und $MgCl_2$ durchgeführt wurden, ergab eine Geschwindigkeitskonstante des Transfers von 35 s^{-1}. Da aus meßtechnischen Gründen die Transferreaktion mit der Zugabe von $tRNA^{Ser}$ zum aktivierten Komplex gestartet werden mußte, beschreibt die Geschwindigkeitskonstante des Transfers nicht nur die chemische Reaktion zwischen Seryl-Adenylat und $tRNA^{Ser}$, sondern auch die Bindung von $tRNA^{Ser}$ an den aktivierten Komplex. Es gibt einige Evidenzen dafür, daß dieser Prozeß der tRNA-Bindung und nicht die chemische Veresterungsreaktion die Geschwindigkeit des Transfers limitiert: Wie schon mehrfach erwähnt, besitzt die relaxationskinetisch ermittelte Geschwindigkeitskonstante für den langsamen Schritt der $tRNA^{Ser}$-Bindung, die Umlagerung des SRS-

$tRNA^{Ser}$-Komplexes, einen Wert von 5o s^{-1} (1o); eine vergleichbare Konstante (45 s^{-1}) ließ sich für die Bindung der $tRNA^{Ser}$ in Gegenwart der niedermolekularen Substrate aus den quenched-flow-Experimenten unter Substrat-Präinkubation der Synthetase ableiten (s. o.); wurden die Transferversuche bei einer Konzentration an freien Mg^{2+}-Ionen (1o mM $MgCl_2$ bei 5 mM ATP) durchgeführt, die der bei den relaxationskinetischen Messungen in (1o) verwendeten Konzentration entspricht, so resultierte eine Transferkonstante von 45 s^{-1}. Die weitgehende Übereinstimmung zwischen den jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten spricht für die Annahme, daß die Konformationsänderung des SRS-$tRNA^{Ser}$-Komplexes, die in Abwesenheit der niedermolekularen Substrate nachgewiesen wurde, auch bei hohen Konzentrationen an ATP und Serin und in Gegenwart der aktivierten Aminosäure mit praktisch unveränderter Geschwindigkeit abläuft. Anders ist die Situation bei geringen Serinkonzentrationen. Hier besitzt die Geschwindigkeitskonstante des Transfers einen Wert von 18 s^{-1}. Die niedrigere Geschwindigkeitskonstante ist am ehesten damit zu erklären, daß unter diesen Bedingungen eine weitere Umlagerung des ternären Komplexes aus SRS, $tRNA^{Ser}$ und aktiviertem Serin so langsam ist, daß sie zur Begrenzung der Transfergeschwindigkeit beiträgt. Geht man von dieser Hypothese aus, so stellt sich die katalytisch aktive Bindung der $tRNA^{Ser}$ an die SRS als ein mehrstufiger Prozeß dar, wie er in ähnlicher Weise bereits für das PRS-$tRNA^{Phe}$-System diskutiert worden ist (s. o.): Nach der Bildung eines ersten, unspezifischen Begegnungskomplexes zwischen SRS und $tRNA^{Ser}$ erfolgt eine Umlagerung zu einem intermediären Komplex, in dem die $tRNA^{Ser}$ schon an einer spezifischen Bindungsstelle gebunden ist; in Gegenwart von Seryl-Adenylat findet dann eine weitere Konformationsänderung des ternären Komplexes statt, die möglicherweise zu einer für die Veresterungsreaktion notwendi-

gen Feinanpassung zwischen tRNA und Synthetase führt. Nach dieser Modellvorstellung, die sicherlich noch experimentell untermauert werden muß, kommt die beobachtete Serin-Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante des Transfers dadurch zustande, daß Serin als allosterischer Effektor die Geschwindigkeit der zweiten, von der Anwesenheit der aktivierten Aminosäure abhängigen Konformationsänderung des Synthetase-tRNA-Komplexes beeinflußt. Infolgedessen ist bei hohen Serinkonzentrationen praktisch nur der erste Umlagerungsschritt geschwindigkeitslimitierend für die Transferreaktion.

Die Geschwindigkeitskonstante des Transfers bei hohen Substratkonzentrationen wurde durch die Anwesenheit der Produkte der Aminoacylierungsreaktion, AMP, Pyrophosphat und Seryl-$tRNA^{Ser}$, nicht beeinflußt. Dieser Befund zeigt, daß die geschwindigkeitslimitierende Konformationsänderung des Synthetase-tRNA-Komplexes auch ein Bestandteil des Aminoacylierungsmechanismus unter Fließgleichgewichtsbedingungen ist. Keinen Einfluß auf die Geschwindigkeitskonstante des Transfers hatte auch der Zusatz von nicht-zugehöriger Hefe-tRNA, sofern die Konzentration der Mg^{2+}-Ionen an die veränderte Nukleinsäurekonzentration angepaßt war. Folglich ist der Umlagerungsschritt im Prozeß der tRNA-Bindung auch dann geschwindigkeitsbestimmend für die Transferreaktion, wenn zuvor die richtige Auswahl zwischen verschiedenen tRNAs erfolgen muß. Weitgehende Übereinstimmung besteht zwischen der in den Transferexperimenten bestimmten Dissoziationskonstante von $tRNA^{Ser}$ und dem unter vergleichbaren Bedingungen im quasi-stationären Zustand der Aminoacylierung ermittelten K_M-Wert für $tRNA^{Ser}$ (72). Anzeichen für die Beteiligung einer zweiten $tRNA^{Ser}$ an der Transferreaktion wurden nicht gefunden. In früheren Untersuchungen ist unter nicht-reaktiven Bedingungen mit verschiedenen experimentellen Techniken

gezeigt worden, daß ATP einen antagonistischen Effekt auf die Bindung der $tRNA^{Ser}$ ausübt (9, 1o, 2o, 21). Die gleiche Beobachtung wurde in den Transferexperimenten gemacht. Damit ist bestätigt, daß der antagonistische Einfluß von ATP auf die Affinität der Synthetase zu $tRNA^{Ser}$ auch unter Reaktionsbedingungen vorhanden ist. Die Gegenwart von Pyrophosphat verändert nicht die Geschwindigkeitskonstante des Transfers, wohl aber die Transferamplitude. Allerdings entspricht die Menge des transferierten Serins über den ganzen untersuchten Bereich der Pyrophosphatkonzentration der im Filterbindungstest nachweisbaren Konzentration des aktivierten Komplexes. Offensichtlich beeinflußt die Pyrophosphatkonzentration nur das Aktivierungsgleichgewicht, nicht aber das Bindungsgleichgewicht der $tRNA^{Ser}$. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Befund überein, daß Pyrophosphat die Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$ im quasi-stationären Zustand nicht-kompetitiv zu $tRNA^{Ser}$ hemmt (72). Es gibt also eine Reihe von experimentellen Belegen für die Annahme, daß die Aussagen zum Transferprozeß, die aus den quenched-flow-Messungen im ersten Reaktionszyklus der SRS gewonnen wurden, auch für den Reaktiosmechanismus der Synthetase im quasi-stationären Zustand der Aminoacylierung relevant sind.

Die Dissoziation von Seryl-$tRNA^{Ser}$ ist, entgegen früheren Vermutungen (19), ein schneller Teilschritt im Gesamtprozeß der Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$. Die Ergebnisse des Transferexperiments bei hohen Substratkonzentrationen und in Gegenwart von Seryl-$tRNA^{Ser}$ lassen einige Schlußfolgerungen zu: (i) Unter diesen Bedingungen kann Serin auch in Gegenwart der beladenen $tRNA^{Ser}$ aktiviert werden; (ii) die unbeladene $tRNA^{Ser}$ verdrängt die Seryl-$tRNA^{Ser}$ von der Synthetase, die Geschwindigkeitskonstante für diesen Vorgang besitzt einen Wert von ca. 7o s^{-1}; (iii) die Übertragung des

aktivierten Serins auf die $tRNA^{Ser}$ findet erst statt, wenn die acylierte $tRNA^{Ser}$ ihre Bindungsstelle an der Synthetase verlassen hat. In Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$ scheint die Dissoziation der Seryl-$tRNA^{Ser}$ langsamer vonstatten zu gehen. Jedenfalls haben stopped-flow-kinetische Messungen, die unter sonst ähnlichen Konzentrationsbedingungen in Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$ durchgeführt worden waren, für die Abdissoziation der beladenen $tRNA^{Ser}$ von der Synthetase eine Geschwindigkeitskonstante von 23 s^{-1} ergeben (37). Der Befund, daß die unbeladene $tRNA^{Ser}$ die Seryl-$tRNA^{Ser}$ aus ihrer Bindung zur Synthetase verdrängt, läßt sich als Hinweis auf die reaktionskinetische Bedeutung der Anticooperativität in der $tRNA^{Ser}$-Bindung durch die SRS (11) diskutieren. Weitere Experimente sind jedoch nötig, um den Mechanismus der Seryl-$tRNA^{Ser}$-Dissoziation und den Einfluß, den die Bindung der $tRNA^{Ser}$ auf diesen Vorgang hat, auch im Detail verstehen zu können.

Wie die Versuche zur Serin-abhängigen ATP-Hydrolyse und die PP_i-ATP-Austauschexperimente gezeigt haben, gibt es zwei kinetisch verschiedene Mechanismen der Aktivierung von Serin: In Gegenwart von hohen Konzentrationen an $tRNA^{Ser}$ ist die Geschwindigkeit der Aktivierung kaum größer als die Geschwindigkeit der gesamten Aminoacylierungsreaktion; in Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$ ist die Aktivierung zwar immer noch der langsamste Schritt im Reaktionsmechanismus der SRS, aber ihre Geschwindigkeit ist nun ca. 6 - 8 mal größer als die der Aminoacylierung unter weitgehender Sättigung der Synthetase mit $tRNA^{Ser}$. Da die $tRNA^{Ser}$ offenbar mit gleicher Affinität an die freie Synthetase wie an den aktivierten Komplex bindet, spricht nichts gegen die Annahme, daß beide Reaktionswege auch bei der Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$ unter Fließgleichgewichtsbedingungen durchlaufen werden können. Es

ist klar, daß die schrittweise Synthese von Seryl-$tRNA^{Ser}$, d. h. Aktivierung in Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$ und anschliessende Assoziation und Beladung der $tRNA^{Ser}$, bei niedrigen $tRNA^{Ser}$-Konzentrationen überwiegt. Aber auch bei höheren $tRNA^{Ser}$-Konzentrationen dürfte noch ein signifikanter Anteil der tRNA auf diesem Weg aminoacyliert werden, da der konkurrierende Mechanismus, bei dem zunächst alle Substrate einschließlich der $tRNA^{Ser}$ an die SRS gebunden werden, ehe die Aktivierung von Serin als erster chemischer Reaktionsschritt erfolgt, beträchtlich langsamer ist. So läßt sich mit den gemessenen Geschwindigkeitsdaten in erster Näherung abschätzen, daß unter den in dieser Arbeit üblicherweise verwendeten Konzentrationsbedingungen (2o µM $tRNA^{Ser}$, K_M ($tRNA^{Ser}$) = o,59 µM bei 5 mM ATP, o,5 mM Serin) noch etwa lo % der Seryl-$tRNA^{Ser}$-Moleküle auf dem Reaktionsweg über die Aktivierung in Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$ gebildet werden können. Bei genauerer Betrachtung muß man zumindest noch den Einfluß der Pyrophosphat-Konzentration auf das Aktivierungsgleichgewicht berücksichtigen, der in Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$ (K_D (PP_i) = 25 µM) stärker ins Gewicht fällt. Dadurch reduziert sich die Geschwindigkeit der Aktivierung in Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$ etwas, bis zu einer unphysiologisch hohen Pyrophosphatkonzentration von etwa loo µM ist sie aber immer noch schneller als die Aktivierung in Gegenwart von $tRNA^{Ser}$. Mit dem Wechsel zwischen den beiden kinetisch verschiedenen Aktivierungsmechanismen ist es der SRS möglich, Änderungen der Aminoacylierungsgeschwindigkeit aufgrund von Schwankungen der $tRNA^{Ser}$-Konzentration innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereichs relativ klein zu halten. Da die SRS ohnehin zu den "langsamen" Aminoacyl-tRNA-Synthetasen zählt, ist diese Eigenschaft möglicherweise von Bedeutung für eine hinreichend schnelle Proteinbiosynthese in der Hefezelle. Faßt man frühere Messungen zur Abhängig-

keit der Aminoacylierungsgeschwindigkeit von der $tRNA^{Ser}$-Konzentration zusammen, so ergibt sich eine zumindest qualitative Übereinstimmung dieser unter Fließgleichgewichtsbedingungen gewonnenen Daten mit dem hier diskutierten Reaktionsmodell: Bei der doppelt reziproken Auftragung von Aminoacylierungsgeschwindigkeit und tRNA-Konzentration resultiert bei hohen Konzentrationen an $tRNA^{Ser}$ ein hyperbolischer (72), bei niedrigen tRNA-Konzentrationen ein parabolischer Kurvenverlauf (12, 19); im mittleren Konzentrationsbereich (ca. 1 - 10 µM $tRNA^{Ser}$) ändert sich die Geschwindigkeit der Aminoacylierung bei Variation der $tRNA^{Ser}$-Konzentration nur geringfügig. Der nicht-lineare Kurvenverlauf ist in den zitierten Arbeiten stets damit interpretiert worden, daß mehr als eine $tRNA^{Ser}$ an der Aminoacylierungsreaktion beteiligt ist. Zumindest bei niedrigen $tRNA^{Ser}$-Konzentrationen steht diese Annahme aber im Widerspruch zu Ergebnissen aus fluorimetrischen Untersuchungen des Bindungsgleichgewichts der $tRNA^{Ser}$ in Gegenwart von ATP (10). Die Begründung, daß die Abweichungen von einer einfachen Michaelis-Menten-Kinetik auf ein variables, von der $tRNA^{Ser}$-Konzentration abhängiges Verhältnis zweier verschieden schneller Aminoacylierungsreaktionen zurückzuführen ist (was phänomenologisch der Annahme zweier verschieden aktiver, interkonvertierbarer Enzymformen entspricht), vermeidet diesen Widerspruch. Die gleiche Modellvorstellung kann auch benutzt werden, um die Zunahme der Aminoacylierungsgeschwindigkeit mit steigender Salzkonzentration (10, 19) zu erklären. Bei höheren Ionenstärken ist die Affinität der SRS zu $tRNA^{Ser}$ verringert (10), folglich können bei gleicher $tRNA^{Ser}$-Konzentration mit steigender Salzkonzentration zunehmend mehr Synthetasemoleküle die Aktivierung in Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$ katalysieren. Die eigenen Untersuchungen zur Salzabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der SRS haben experimentelle Hinweise

auf die Gültigkeit dieser Erklärung erbracht. Frühere Interpretationen, die Zunahme der Aminoacylierungsgeschwindigkeit beruhe auf einer Salz-abhängigen Beschleunigung der Dissoziation der Seryl-$tRNA^{Ser}$ (19), lassen sich dagegen auf der Basis anderer (37) und eigener Versuchsergebnisse nicht bestätigen.

Ein Faktor, der die Aktivität der SRS ganz wesentlich beeinflußt, ist die Konzentration der Mg^{2+}-Ionen. Die Funktion von Mg^{2+}-Ionen bei der Aminoacylierung der $tRNA^{Ser}$ ist schon in früheren Arbeiten intensiv erforscht worden, die Ergebnisse stimmen weitgehend mit den Befunden bei anderen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen überein. Aus den Untersuchungen ergab sich folgendes Bild: In Abwesenheit von Mg^{2+} ist die SRS praktisch inaktiv (66); auch der Transfer von präaktiviertem Serin auf $tRNA^{Ser}$ findet nur in Gegenwart von Mg^{2+} statt, allerdings kann Mg^{2+} durch andere zweiwertige Kationen wie Mn^{2+}, Cd^{2+}, Ca^{2+} oder durch Spermin ohne Beeinträchtigung der Transferaktivität ersetzt werden (66); Mg^{2+} stabilisiert die Raumstruktur der $tRNA^{Ser}$ in Lösung (92) und ist ausschlaggebend für die spezifische Bindung der $tRNA^{Ser}$ an die SRS, in Abwesenheit von Mg^{2+}-Ionen wird die $tRNA^{Ser}$ in ähnlicher Weise wie nicht-zugehörige tRNAs an die Synthetase gebunden (9, 10); von besonderer Bedeutung für die Geschwindigkeit der Aminoacylierung ist die Wechselwirkung zwischen Mg^{2+} und ATP, wobei freies ATP und Mg_2 ATP keine oder nur eine sehr langsame Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$ ermöglichen, während ein Überwiegen des Mg ATP-Komplexes zu hohen Aminoacylierungsgeschwindigkeiten führt (19); es gibt Hinweise darauf, daß bei der SRS der Mg ATP-Komplex in der anti-Konformation katalytisch aktiv ist (17); möglicherweise bindet Mg^{2+} nicht nur an die Substrate ATP und $tRNA^{Ser}$, sondern auch direkt an die SRS (91) und beeinflußt in dieser Bindung

die Aktivität der Synthetase (19). Die Ergebnisse aus den eigenen Messungen zur Mg^{2+}-Abhängigkeit der Aminoacylierung und einzelner Teilreaktionen stimmen mit den früheren Befunden überein. Darüber hinaus ergänzen sie die Vorstellungen über die katalytische Funktion der Mg^{2+}-Ionen in einigen Punkten. So haben die Messungen zur Mg^{2+}-Abhängigkeit der Aminoacylierungsgeschwindigkeit unter gleichzeitiger Variation der Salzkonzentration gezeigt, daß Mg^{2+}-Ionen durch einwertige Kationen aus katalytisch wichtigen Bindungen verdrängt, aber nicht in ihrer Funktion ersetzt werden können. Gleicht man diesen Salzeffekt durch eine Erhöhung der Konzentration der Mg^{2+}-Ionen aus, so ist die SRS auch in hochkonzentrierten Salzlösungen (2 M) noch ebenso aktiv wie in Lösungen niedriger Ionenstärke. Die Beobachtung, daß im PP_i-ATP-Austauschexperiment maximale Austauschgeschwindigkeiten erst bei höheren Konzentrationen an Mg^{2+}-Ionen erzielt werden als für optimale Aminoacylierungsgeschwindigkeiten nötig sind, läßt darauf schließen, daß Pyrophosphat nur im Komplex mit Mg^{2+} an die SRS binden und die Aktivierung von Serin hemmen kann. Nach dieser Hypothese sollte sich dann der starke Abfall der Aminoacylierungsgeschwindigkeit beim Überschreiten der optimalen Konzentration an Mg^{2+}-Ionen damit erklären lassen, daß neben der Bildung katalytisch inaktiver Mg_2 ATP-Komplexe auch das verstärkte Auftreten von Mg Pyrophosphat zu einer Hemmung der Aminoacylierung führt. Die Resultate aus den Untersuchungen zur Mg^{2+}-Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante des Transfers schließlich lassen sich dahingehend interpretieren, daß mehrere Mg^{2+}-Ionen kooperativ an die $tRNA^{Ser}$ binden, daß die katalytisch wichtigen Mg^{2+}-Bindungsstellen der $tRNA^{Ser}$ bei einer Konzentration an freien Mg^{2+}-Ionen von etwa 5 mM gesättigt sind und daß eine weitere Erhöhung der Mg^{2+}-Konzentration keinen Einfluß auf die katalytischen Eigenschaften der $tRNA^{Ser}$ ausübt.

6.3. Zum Mechanismus der Aktivierung von Serin. Ist Seryl-Adenylat das normale Intermediat bei der Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$?

Die Vorstellung, daß die Aminoacylierung in zwei Reaktionsschritten erfolgt, nämlich der Bildung von Aminoacyl-Adenylat aus Aminosäure und ATP (Aktivierung) und der nachfolgenden Bildung von Aminoacyl-tRNA aus Aminoacyl-Adenylat und tRNA (Transfer), steht im Einklang mit der Mehrzahl der experimentellen Befunde. Im strengen Sinne bewiesen ist diese mechanistische Modellvorstellung jedoch nicht. Zwei Einwände sind gegen den Adenylat-Mechanismus erhoben worden. Der erste Einwand betrifft die Rolle des Aminoacyl-Adenylats als Intermediat der Aminoacylierungsreaktion. R. B. Loftfield und Mitarbeiter postulierten vor einigen Jahren einen Aminoacylierungsmechanismus, bei dem sich die Substrate ATP, Aminosäure und tRNA in einem Schritt ohne Bildung von stabilen Zwischenstufen in die Produkte Aminoacyl-tRNA, AMP und Pyrophosphat umlagern können (93). Nach dieser Vorstellung tritt Aminoacyl-Adenylat nur in Abwesenheit von beladbarer tRNA als Endprodukt der Reaktion zwischen Aminosäure und ATP auf. In der Folgezeit wurden im Loftfield'schen Arbeitskreis eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt (57, 94, 95), deren Ergebnisse einen "konzertierten" Mechanismus als durchaus ernst zu nehmende Alternative zum "schrittweisen" Adenylat-Mechanismus erscheinen lassen. Der zweite Einwand zielt in die entgegengesetzte Richtung. In mehreren Laboratorien sind Anzeichen dafür gefunden worden, daß die aktivierte Aminosäure nicht nur in Form des Anhydrids mit Adenylsäure vorkommt, sondern auch in einer reaktiven kovalenten Bindung direkt zur Synthetase (28, 96, 97). Es ist daher nicht auszuschließen, daß eine solche kovalent an das Enzym gebundene Aminosäure zumindest bei manchen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen

eine weitere Zwischenstufe im Mechanismus der Aminoacylierung darstellt. Lassen sich aufgrund der eigenen experimentellen Befunde Aussagen darüber machen, welche der drei durch die Anzahl der Zwischenprodukte (o, 1, 2) charakterisierten Modellvorstellungen auf den Reaktionsmechanismus der SRS unter Fließgleichgewichtsbedingungen am ehesten zutrifft?

Von A. Fersht, der als erster die quenched-flow-Technik für kinetische Untersuchungen an Aminoacyl-tRNA-Synthetasen eingesetzt hat, um den Adenylat-Mechanismus experimentell zu beweisen, stammt die folgende Formulierung der Kriterien für eine Entscheidung der Frage nach der Intermediat-Natur des Aminoacyl-Adenylats (98): " The aminoacyl adenylate pathway is proved very simply ..... using the three criteria for proof: the intermediate is isolated, it is formed fast enough, and reacts fast enough to be on the reaction pathway." Im Fall der Seryl-tRNA-Synthetase sind diese Kriterien erfüllt: (i) In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (66) konnte in der vorliegenden Arbeit ein SRS Seryl-Adenylat-Komplex isoliert werden; (ii) anhand der Ergebnisse aus den kinetischen Messungen der ATP-Hydrolyse und des PP_i-ATP-Austauschs in Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$ konnte gezeigt werden, daß die Geschwindigkeit der Bildung von Seryl-Adenylat grösser ist als die Aminoacylierungsgeschwindigkeit unter Fließgleichgewichtsbedingungen; (iii) mit Hilfe der Transferexperimente schließlich konnte nachgewiesen werden, daß die Geschwindigkeit der Reaktion des Seryl-Adenylat-Komplexes mit $tRNA^{Ser}$ wesentlich größer ist als die Wechselzahl der SRS im quasi-stationären Zustand der Aminoacylierung. Dennoch läßt sich aus diesen Befunden nur mit Einschränkungen die Behauptung ableiten, daß die Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$ über Seryl-Adenylat als Intermediat erfolgt. Zutreffend ist

diese Aussage sicher für den Mechanismus der Aminoacylierung, der bei niedriger $tRNA^{Ser}$-Konzentration oder bei hohen Ionenstärken überwiegt. Hier erfolgt zunächst die Synthese von Seryl-Adenylat, ehe die $tRNA^{Ser}$ an den aktivierten Komplex bindet und beladen wird. Unklar ist aber, ob der Adenylat-Mechanismus auch bei hohen $tRNA^{Ser}$-Konzentrationen und bei niedriger Ionenstärke verwirklicht ist. Unter diesen Bedingungen ist die Geschwindigkeit der Aktivierung kaum grösser als die Geschwindigkeit der gesamten Aminoacylierungsreaktion. Andererseits entspricht die Transfergeschwindigkeit, zumindest bei hohen Serinkonzentrationen, in etwa der Geschwindigkeit, mit der die $tRNA^{Ser}$ an die Synthetase bindet. Da bei hohen $tRNA^{Ser}$-Konzentrationen die Bindung der $tRNA^{Ser}$ vor der Aktivierung erfolgt, bleibt die Frage offen, ob die Aktivierungsreaktion noch zu einem Zwischenprodukt von meßbarer Lebensdauer führt oder ob nach der Bildung des SRS ATP Serin $tRNA^{Ser}$-Komplexes alle Substrate in einem Reaktionsschritt in die Produkte umgewandelt werden. Weitere Untersuchungen sind daher nötig, um entscheiden zu können, ob SRS die Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$ generell nach einem "schrittweisen" Mechanismus mit Seryl-Adenylat als Intermediat katalysiert oder ob unter bestimmten Bedingungen ein "konzertierter" Mechanismus der Aminoacylierung wirksam ist.

Direkte Hinweise auf die Existenz eines weiteren aktivierten Zwischenprodukts außer Seryl-Adenylat wurden nicht gefunden. Als indirektes Anzeichen könnten allenfalls die Resultate der Untersuchungen zur Stöchiometrie der ATP-Hydrolyse bei der Aktivierung in Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$ und bei der Aminoacylierung im quasi-stationären Zustand gewertet werden. Aus dem gemessenen Verhältnis zwischen ATP-Verbrauch und Synthese von Seryl-Adenylat bzw. Seryl-$tRNA^{Ser}$ läßt sich die Folgerung ableiten, daß die SRS parallel oder nachfolgend

zur Bildung von Seryl-Adenylat noch mindestens eine weitere Serin-abhängige, ATP-verbrauchende Reaktion katalysiert. Mit den vorhandenen experimentellen Ergebnissen ist eine genauere Charakterisierung dieser Reaktion und der resultierenden Produkte nicht möglich, eine weitere Form des aktivierten Serins, die als Intermediat bei der Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$ dienen könnte, scheint aber nicht dabei gebildet zu werden. Jedenfalls war die Menge an Serin, die von einem präformierten aktivierten Komplex auf $tRNA^{Ser}$ transferiert werden konnte, unter den verschiedensten Konzentrationsbedingungen praktisch identisch mit der Menge des Seryl-Adenylat-Komplexes, die in der gleichen Lösung nachgewiesen werden konnte. Dieser Befund spricht eher dafür, daß Seryl-Adenylat das einzige aktive Zwischenprodukt der Aminoacylierungsreaktion ist.

6.4. Zum Reaktionsmechanismus von Phenylalanyl-tRNA-Synthetase. Vergleich mit Seryl-tRNA-Synthetase

Auch PRS katalysiert die Aminoacylierung der zugehörigen tRNA nach einem "schrittweisen" Mechanismus mit Phenylalanyl-Adenylat als Intermediat. Diese Aussage stützt sich auf folgende Indizien: Die Bildung von Phenylalanyl-Adenylat ist nachgewiesen (27, 28, 35); die Geschwindigkeit der Adenylat-Synthese, im PP_i-ATP-Austausch gemessen, ist auch in Gegenwart von $tRNA^{Phe}_i$ höher als die Aminoacylierungsgeschwindigkeit (27, 80); die Ergebnisse der eigenen quenched-flow-kinetischen Messungen zeigen, daß auch der Phenylalanin-Transfer von einem präformierten Phenylalanyl-Adenylat-Komplex auf $tRNA^{Phe}$ schneller abläuft als die vollständige Aminoacylierungsreaktion. Der Befund, daß die Transfergeschwindigkeit wesentlich langsamer als die Geschwindigkeit

der Bindung von $tRNA^{Phe}$ an die Synthetase ist, spricht gegen die Existenz eines "konzertierten" Mechanismus. Unklar ist, ob Phenylalanyl-Adenylat das einzige Intermediat der Aminoacylierung von $tRNA^{Phe}$ darstellt; es gibt einige Anzeichen dafür, daß auch andere Formen der aktivierten Aminosäure auftreten können (28, 96).

Der Reaktionsmechanismus von PRS bei niedrigen ATP- und Phenylalanin-Konzentrationen zeigt einige Übereinstimmung zum Reaktionsmechanismus von SRS. In beiden Fällen ist ein Prozeß im Zusammenhang mit der Aktivierungsreaktion geschwindigkeitsbestimmend für die Aminoacylierung. Die Geschwindigkeit der Aktivierung von Serin wird durch die Anwesenheit von $tRNA^{Ser}$ verlangsamt, das gleiche gilt, PP_i-ATP-Austauschversuchen nach zu urteilen (27, 8o), für die Aktivierung von Phenylalanin in Gegenwart von $tRNA^{Phe}$. Es ist daher anzunehmen, daß analog zu den weiter oben diskutierten Verhältnissen bei SRS auch die Aminoacylierung von $tRNA^{Phe}$ auf zwei verschiedenen Reaktionswegen erfolgen kann, die sich in der Reihenfolge von Aktivierung und tRNA-Assoziation unterscheiden. Für PRS konnte bereits aus reaktionskinetischen Untersuchungen im quasi-stationären Zustand der Aminoacylierung ein Reaktionsschema abgeleitet werden, das die Reihenfolge von Substrat-Assoziationen und Produkt-Dissoziationen sowie die Zusammensetzung der intermediären Enzymkomplexe beschreibt (36). Dieses Schema setzt sich aus zwei alternativen Reaktionswegen zusammen: Bei niedrigen Konzentrationen an $tRNA^{Phe}$ findet die Aktivierung von Phenylalanin statt, ehe $tRNA^{Phe}$ an die Synthetase bindet, bei hohen $tRNA^{Phe}$-Konzentrationen erfolgt dagegen die Bindung der tRNA bereits vor der Aminosäure-Aktivierung. Die Aussagen zum Reaktionsmechanismus von PRS, die über die kinetische Charakterisierung der Teilreaktionen gewonnen wurden, stehen also in Ein-

klang mit den Befunden aus der kinetischen Analyse der Aminoacylierung im quasi-stationären Zustand.

Bei hohen Konzentrationen an ATP und Phenylalanin wird der Transferschritt geschwindigkeitslimitierend für die Aminoacylierung von $tRNA^{Phe}$, während im Serin-spezifischen System bei gleichen Konzentrationsverhältnissen die Aktivierungsreaktion unverändert der langsamste Teilschritt der Aminoacylierung ist. PRS besitzt als funktionelles Dimer ($(\beta)_2$) zwei katalytische Zentren, die Bindung von ATP und Phenylalanin erfolgt anticooperativ und die Synthetase zeigt Halb-Seiten-Reaktivität (23, 35). Einer der Vorteile der Halb-Seiten-Reaktivität von Enzymen besteht bekanntlich darin, daß über eine Wechselwirkung zwischen zwei aktiven Zentren des Enzyms ein katalytischer Schritt an einem Zentrum mit der Substratbindung am anderen Zentrum energetisch gekoppelt werden kann (99). In diesem Sinne läßt sich auch der Wechsel im geschwindigkeitsbegrenzenden Schritt der Aminoacylierung von $tRNA^{Phe}$ beim Übergang von niedrigen zu hohen Konzentrationen an ATP und Phenylalanin interpretieren. Bei 100 µM ATP und 50 µM Phenylalanin ist ein katalytisches Zentrum der PRS ($K_M^{(I)}$(ATP) = 70 µM, $K_M^{(I)}$(Phe) = 6 µM, (35)) weitgehend mit Substraten gesättigt, das zweite Zentrum ($K_M^{(II)}$(ATP) = 400 µM, $K_M^{(II)}$(Phe) = 30 µM, (35)) ist dagegen noch kaum besetzt. Unter diesen Bedingungen können in der Transferreaktion etwa 0,75 Mol Phenylalanin pro Mol PRS auf $tRNA^{Phe}$ übertragen werden; geschwindigkeitslimitierend für die Aminoacylierungsreaktion ist ein langsamer Vorgang im Zusammenhang mit der Aktivierung des Phenylalanins. Bei hohen Konzentrationen an ATP (5 mM) und Phenylalanin (0,5 mM) ist dagegen auch das zweite katalytische Zentrum der PRS Substrat-gesättigt. Die Reaktivität des zweiten Zentrums ist jedoch behindert, daher beträgt die Transferamplitude nur

etwa 1,2 Mol Phenylalanin pro Mol Synthetase; lediglich in Gegenwart von Pyrophosphatase können 2 Mol Phenylalanin pro Mol PRS auf $tRNA^{Phe}$ transferiert werden. Die Besetzung des zweiten Zentrums mit ATP und Phenylalanin führt aber über eine Wechselwirkung der Zentren untereinander zu einer erheblichen Beschleunigung der Aktivierung am ersten Zentrum, so daß dieser Schritt nicht mehr die Katalysegeschwindigkeit der Synthetase limitiert. Stattdessen ist nun der Transfer von aktiviertem Phenylalanin auf $tRNA^{Phe}$ der langsamste Teilschritt der Aminoacylierungsreaktion.

Unter den experimentellen Bedingungen der vorliegenden Untersuchungen reagiert bei SRS nur ein katalytisches Zentrum. Diese Aussage ergibt sich aus der Tatsache, daß in den Filterbindungsversuchen und Transferexperimenten selbst in Gegenwart von Pyrophosphatase lediglich eine maximale Stöchiometrie von 1 Mol Seryl-Adenylat pro Mol Synthetase gefunden wurde. SRS besitzt aber mindestens zwei Bindungsstellen für jedes Substrat (4, 6, 8, 12, 13, 19; Hinweise auf eine zweite Serin-Bindungsstelle gaben auch die eigenen Transferexperimente); es ist daher denkbar, daß auf der aus zwei gleich großen Untereinheiten aufgebauten SRS auch ein zweites aktives Zentrum existiert. Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, daß die Wechselzahl der SRS bei sehr hohen Serinkonzentrationen (K_M-Wert ca. 80 mM) stark zunimmt. Da Aminoacylierungsgeschwindigkeiten von über 100 s^{-1} erreicht werden können, muß unter diesen Bedingungen die Kinetik der einzelnen Teilschritte der Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$ grundlegend verändert sein. Möglicherweise zeigt also SRS ebenso wie PRS das Phänomen der Halb-Seiten-Reaktivität; weitere Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Synthetase bei sehr hohen Serinkonzentrationen dürften hierzu interessante Aufschlüsse ergeben.

6.5. Zur Aminosäure-Spezifität der Seryl-tRNA-Synthetase

Bei der Aminoacylierung von tRNA in vivo müssen die Synthetasen aus einer Vielzahl verschiedener Aminosäuren und tRNAs die passenden Substrate auswählen. Da in späteren Stadien der Proteinbiosynthese eine Fehlbeladung von tRNA nicht mehr korrigiert werden kann, ist für die fehlerfreie Synthese funktionstüchtiger Proteine eine hohe Spezifität der Wechselwirkung von Synthetasen und Aminosäuren bzw. tRNAs erforderlich. Manche Aminosäuren sind sich aber im strukturellen Aufbau so ähnlich, daß eine ausreichende Diskriminierung zwischen ihnen aufgrund von Unterschieden in der Bindungsenergie nicht möglich ist. So bindet und aktiviert beispielsweise Valyl-tRNA-Synthetase aus verschiedenen Organismen außer Valin auch Threonin (55, 76), und Isoleucyl-tRNA-Synthetase aus E.coli außer Isoleucin auch Valin (1oo). Die Fehlerrate der Aktivierung in beiden Systemen (1o1) ist um zwei Größenordnungen höher als die experimentell nachgewiesene Fehlerrate des Aminosäure-Einbaus in Protein (3×10^{-4}, (1o2)). Beide Synthetasen sind aber in der Lage, in Gegenwart der zugehörigen tRNA die biologisch unerwünschte Aminosäure auf der Stufe der fehlbeladenen tRNA ((55, 56, 76, 1o3), Isoleucyl-tRNA-Synthetase möglicherweise auch auf der Stufe des Aminoacyl-Adenylats (56)) über einen Korrekturmechanismus zu erkennen und hydrolytisch aus der Reaktion zu entfernen. Dieser zusätzliche "editing"- oder "proofreading"-Mechanismus ermöglicht es Valyl- und Isoleucyl-tRNA-Synthetase, die Aminoacylierung mit der für eine korrekte Proteinbiosynthese notwendigen hohen Spezifität zu katalysieren. Es gibt Anzeichen dafür, daß auch Leucyl- (75, 1o4), Methionyl- (1o5) und Phenylalanyl-tRNA-Synthetase (32, 77) eine ausreichende Aminosäure-Spezifität nur mit Hilfe eines Korrekturmechanismus erzielen können.

Im Falle der SRS sollten anstelle von Serin am ehesten Cystein oder Alanin gebunden und aktiviert werden können. Die Untersuchungen zur Aminosäure-Spezifität zeigten aber, daß SRS auch ohne einen zusätzlichen Korrekturschritt mit großer Genauigkeit gegen diese Aminosäuren diskriminiert. Innerhalb der Nachweisgrenzen konnte weder mit Cystein noch mit Alanin eine PP_i-ATP-Austauschaktivität der Synthetase oder eine Inhibition der Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$ mit Serin beobachtet werden. Mit Hilfe der experimentellen Daten läßt sich abschätzen, daß bei gleichzeitiger Anwesenheit von Serin, Cystein und Alanin in etwa äquimolaren Konzentrationen eine Fehlaktivierung durch SRS mit einer Häufigkeit von maximal $1 : 10^4$ auftreten kann. Dieser obere Grenzwert, der in der Realität möglicherweise weit unterschritten wird, liegt in der gleichen Größenordnung wie die experimentell bestimmte Fehlerrate der Proteinbiosynthese.

Eine hohe Spezifität der SRS bereits auf der Stufe der Aminosäure-Bindung und -Aktivierung zeigte sich auch in den Versuchen mit nicht-proteinogenen, aber strukturell mit Serin verwandten Aminosäuren. So wurde mit 2,3-Diaminopropionsäure, α-Methylserin oder Homoserin im Rahmen der Meßgenauigkeit gleichfalls weder ein Pyrophosphat-Austausch noch eine Hemmung der Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$ mit Serin beobachtet. Die experimentellen Resultate legen einige Annahmen über die Beschaffenheit der Aminosäure-Bindungsstelle der SRS nahe. Die geringe Affinität der Synthetase zu Aminosäuren mit größerer Seitenkette als Serin (z. B. Homoserin, auch Asparaginsäure und, mit Einschränkungen, Threonin) oder mit größeren Substituenten als Wasserstoff am α-C-Atom (α-Methylserin) ist wohl auf eine sterische Behinderung der Bindung dieser Aminosäuren zurückzuführen. Offensichtlich ist der räumliche Aufbau der Bindungsstelle sehr genau der

Struktur des Serin-Moleküls angepaßt. Die ausgeprägte Fähigkeit der SRS, zwischen Serin und Alanin (kleinere Seitenkette) zu diskriminieren, läßt auf einen stark polaren Charakter der Bindungsregion für die Aminosäure-Seitenkette schließen. Wahrscheinlich tragen Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen der Hydroxyl-Gruppe des Serins und geeigneten Gruppierungen an der Bindungsstelle ganz wesentlich zur Stabilisierung des SRS Serin-Komplexes bei. Es ist anzunehmen, daß die Anzahl und Stärke dieser Wasserstoff-Brückenbindungen auch das ausschlaggebende Kriterium ist für die Unterscheidung von Serin und Cystein bzw. 2,3-Diaminopropionsäure durch die Synthetase.

Der zunächst überraschende Befund, daß SRS außer mit Serin auch mit Leucin, Valin und α-Aminobuttersäure sehr effektiv einen PP_i-ATP-Austausch katalysiert, konnte durch den Nachweis einer Kontamination des Synthetase-Präparates mit Leucyl-tRNA-Synthetase auf einfache Weise erklärt werden. Die Reinheit von SRS-Präparaten ist bislang immer nur nach gelelektrophoretischen Kriterien angegeben worden; lediglich Cantoni und Mitarbeiter hatten für ihre Synthetase die Adenylatbildung mit Leucin und Phenylalanin getestet (66), ihre Nachweismethode (Filterbindungstest) war aber zu unempfindlich, um geringe Verunreinigungen mit Leucyl- oder Phenylalanyl-tRNA-Synthetase wirklich auszuschließen. Die eigenen Rechromatographierungsversuche mit SRS haben gezeigt, daß eine quantitative Abtrennung von Leucyl-tRNA-Synthetase mittels Ionenaustauscher-Säulen nicht möglich ist. Offensichtlich wird hierfür ein spezifischeres chromatographisches Verfahren wie beispielsweise die Affinitätschromatographie benötigt. Eine zufriedenstellende Reinigung von SRS mittels affinitätschromatographischer Methoden ist jedoch bisher nicht beschrieben worden (7, 106).

Solange also die Voraussetzungen für eine vollständige Abtrennung der Leucyl-tRNA-Synthetase nicht erfüllt sind, lassen sich weitergehende, quantitative Angaben zur Aminosäure-Spezifität der SRS nur schwer gewinnen. Schon die qualitativen Abschätzungen, die aufgrund der vorliegenden Experimente möglich waren, sprechen aber für die Annahme, daß SRS auch ohne einen zusätzlichen Korrekturmechanismus mit ausreichender Genauigkeit zwischen Serin und strukturell ähnlich aufgebauten Aminosäuren unterscheiden kann.

7. MATERIALIEN UND METHODEN

7.1. Enzyme

Seryl-tRNA-Synthetase (E.C.6.1.1.11) und Phenylalanyl-tRNA-Synthethase (E.C.6.1.1.2o) wurden in Zusammenarbeit mit U. Pachmann aus Brauerei-Hefe (Saccharomyces Carlsbergensis C 836) nach den in (7, 19) beschriebenen Verfahren isoliert. Die gereinigten Enzympräparate zeigten in der SDS-Gelelektrophorese nach (1o7) weniger als 5 % Kontamination mit anderen Proteinen. Die spezifischen Aktivitäten der Synthetasen entsprachen früheren Angaben (7).

Ein PRS-Rohenzym aus E.coli (1oo-S-Überstand) wurde von R. Thiebe zur Verfügung gestellt. Anorganische Pyrophosphatase (E.C.3.6.1.1) stammte von Boehringer Mannheim, Mannheim, T1-RNase (E.C.3.1.27.3) wurde von Sankyo, Tokio, bezogen.

7.2. tRNA

Unfraktionierte tRNA aus Brauereihefe stammte von Boehringer Mannheim, Mannheim. Nach (1o8) gereinigte $tRNA^{Phe}$ (Akzeptoraktivität 1,4 nMol Phenylalanin/A_{26o}-Einheit) wurde von R. Thiebe und W. Wintermeyer zur Verfügung gestellt. $tRNA^{Ser}$ wurde nach dem in (1o9) angegebenen Verfahren isoliert, wobei der letzte Reinigungsschritt in (1o9) durch Chromatographie an DEAE-Sephadex A-25 nach (11o) ersetzt war. Die Akzeptoraktivität betrug 1,3 nMol Serin/A_{26o}-Einheit, die gelelektrophoretische Reinheit war größer als 95 %. Die $tRNA^{Ser}$-Fraktionen enthielten jedoch eine farblose, in Alkohol unlösliche Begleitsubstanz, die über Molekularsieb-Chro-

matographie (Sephadex G-1oo) abgetrennt werden konnte. Diese Substanz zeigte keine UV-Absorption, die Niederschlagsbildung mit Ba^{2+}-Ionen und das IR-Spektrum sprachen für die Anwesenheit von Sulfat-Ionen. Die Verunreinigung trat in nachfolgenden $tRNA^{Ser}$-Präparationen, bei denen $Mg(OAc)_2$ statt $MgSO_4$ als Elutionsmittel für die Chromatographie an DEAE-Sephadex A-25 verwendet worden war, nicht mehr auf.

Auf verschiedenen Stufen der Isolierung wurden andere chromatographische Verfahren auf ihre Eignung zur Anreicherung von $tRNA^{Ser}$ getestet: (a) Chromatographie an Sepharose 4 B mit absteigendem Salzgradienten (111), (b) Auftrennung im RPC-5-System (112), (c) Chromatographie an Acrylphenylneutralrot-Acrylamid-Copolymeren (113). Nach (a) und (c) konnten keine zufriedenstellenden Anreicherungen von $tRNA^{Ser}$ erzielt werden. Nach Verfahren (b) konnte $tRNA^{Ser}$ bis zu einer Akzeptoraktivität von 1,4 nMol Serin/A_{260}-Einheit angereichert werden, durch anschließende Alkoholfällung nahm die Beladbarkeit der $tRNA^{Ser}$ jedoch irreversibel um bis zu 3o % ab.

Alle verwendeten chromatographischen Verfahren wurden zusätzlich auf ihre Eignung zur Auftrennung der majoren $tRNA^{Ser}$-Isoakzeptoren (114) untersucht. Dazu wurden aliquote Teile der verschiedenen tRNA-Fraktionen, die bei einem chromatographischen Reinigungsschritt anfielen, mit T1-RNase gespalten. Über die elektrophoretische Auftrennung der resultierenden Oligonucleotid-Gemische in 22 %igen Polyacrylamid-Harnstoff-Gelen ließ sich das Verhältnis von $tRNA^{Ser}_{(I)}$ zu $tRNA^{Ser}_{(II)}$ in den Fraktionen bestimmen. Lediglich bei der Chromatographie an BD-Cellulose in 7 M Harnstoff, pH 3,o, wurde eine, allerdings unvollständige, Separierung der beiden Isoakzeptoren beobachtet. Dieser Befund stimmt mit frü-

heren Angaben in (115) überein. Die in dieser Arbeit verwendeten $tRNA^{Ser}$-Präparate enthielten $tRNA^{Ser}_{(I)}$ und $tRNA^{Ser}_{(II)}$ in äquimolaren Mengen.

7.3. Chemikalien

[^{14}C]-markierte Aminosäuren mit spezifischen Radioaktivitäten zwischen 5 und 2oo Ci/Mol sowie [γ-^{32}P]-ATP (3 Ci/mMol) stammten von The Radiochemical Centre, Amersham, [^{32}P]-Pyrophosphat (2o Ci/mMol) und [^{14}C]-ATP (45 Ci/mol) von New England Nuclear, Boston. Unmarkierte Aminosäuren wurden von California Corp., Los Angeles, bezogen. 3-Aminopyren, Rinderserum-Albumin und ATP waren von Sigma, München, CTP, ADP und AMP von Boehringer Mannheim, Mannheim, Nitrocellulose-Membranfilter von Sartorius, Göttingen, und TNS von Serva, Heidelberg. PEI-Cellulose, Aktivkohle sowie Puffer und Salze stammten von Merck, Darmstadt. Andere Materialien siehe (7, 21). NPM wurde nach (5o) synthetisiert, Essigsäure-2,4-dinitrophenylester nach bekannten Standardverfahren.

7.4. Fluoreszenz-Markierungen

Die fluorimetrischen Untersuchungen wurden mit Hilfe eines Hitachi MPF-2 A Fluoreszenzspektrometers (Perkin-Elmer) durchgeführt. Bei allen Experimenten mit TNS und NPM enthielten die verwendeten Puffer 1o Vol.% Äthanol, um eine bessere Löslichkeit der Farbstoffe zu erreichen. Für die Aminoacylierungskinetiken in Gegenwart von TNS und NPM wurde der Standard-Puffer (s. Kap. 7.6.) ohne Serumalbumin verwendet. Vor der Umsetzung mit NPM wurde PRS 3o min bei 25° C mit 1o mM GSH inkubiert, anschließend wurde GSH bei 0° C über eine Druckdialyse unter Stickstoff rasch quantitativ entfernt.

7.5. Quenched-flow-Messungen

Für reaktionskinetische Experimente mit Inkubationszeiten von 1o - 3oo ms wurde ein quenched-flow-Apparat benutzt. Dieses Gerät war von einer anderen Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt worden, das Funktionsprinzip und technische Details sind in (6o) beschrieben. Vor Beginn der Untersuchungen mußten einzelne Teile des Apparates, darunter auch die Mischkammern, neu angefertigt werden. Die Ergebnisse einer anschließend durchgeführten Funktionskontrolle sind in Abb. 3.1. gezeigt, dort sind auch die in Vergleich zu (6o) veränderten technischen Daten aufgeführt.

Alle quenched-flow-Experimente wurden bei einer Temperatur von 21° C ausgeführt; das Gerät befand sich zu diesem Zweck in einem Labor mit konstant gehaltener Raumtemperatur. Enzym- und Substratlösungen für eine Meßreihe wurden bei 0° C bis zu 2 Stunden aufbewahrt, ein Aktivitätsverlust der Synthetasen während dieser Zeit wurde nicht beobachtet. Vor jeder Messung wurden aliquote Anteile der Lösungen 1o min bei 21° C inkubiert. Das quenched-flow-Gerät war so justiert, daß für eine einzelne Messung je 3oo µl Enzym- und Substratlösung und 3 ml eiskalte Säure (zum Stoppen der Reaktion) benötigt wurden. Bis zur Weiterverarbeitung (Analyse der Produktkonzentration) wurde das erhaltene Produktgemisch (2,65 ml) bei 0° C aufbewahrt.

7.6. Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$ und $tRNA^{Phe}$

Soweit nicht anders angegeben, hatte die verwendete Pufferlösung (Standard-Puffer) folgende Zusammensetzung: 5o mM Tris-HCl, pH 7,o, 1 mM GSH, 1 mM Kaliumkakodylat, o,5 mM $MgCl_2$, o,15 mM EDTA, 1 mg/ml Rinderserumalbumin und 2 Vol.%

Glycerin. In den Experimenten mit PRS enthielt der Puffer zusätzlich 100 mM KCl. Mit Ausnahme der quenched-flow-Kinetiken wurden alle Experimente bei 25° C und mit einem Reaktionsvolumen von 100 µl durchgeführt, Inkubationszeiten und Synthetase-Konzentrationen wurden so gewählt, daß eine lineare Beziehung zwischen der Ausbeute an beladener tRNA und der Reaktionsdauer gewährleistet war. Nach Fällung mit einem Überschuß an eiskalter 5 %iger Trichloressigsäure wurde die Radioaktivität der aminoacylierten tRNA wie in (7) angegeben ermittelt. Blindwerte der Aminoacylierung wurden in Abwesenheit der Synthetase bestimmt.

7.7. Pyrophosphat-Austausch

Anfangsgeschwindigkeiten des PP_i-ATP-Austauschs wurden analog zu der in (101, 116) beschriebenen Methode ermittelt. Für die Messungen wurde der Standardpuffer verwendet, das Reaktionsvolumen betrug 100 µl. Die Inkubation erfolgte bei 25° C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von eiskalter Perchlorsäure (100 µl) gestoppt. Anschließend wurden die Proben mit einer eiskalten Suspension von 2,5 mg Aktivkohle in 200 µl 100 mM Natriumpyrophosphat, 20 mM Natriumacetat, pH 4,5, versetzt und 30 min bei 4° C mechanisch geschüttelt. Danach wurde die Aktivkohle über Glasfaser-Filter abfiltriert und mit dem Pyrophosphat/Acetat-Puffer sowie mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die Radioaktivität der Filter im Flüssigkeits-Szintillationszähler gemessen. Blindwerte des Pyrophosphat-Austauschs wurden in Abwesenheit von Serin oder von SRS ermittelt.

7.8. Messung der [γ-^{32}P]-ATP-Hydrolyse

Das experimentelle Verfahren, mit dem die SRS-katalysierte

Hydrolyse von [γ-^{32}P]-ATP gemessen wurde, gleicht weitgehend der in Kap. 7.7. beschriebenen Meßmethode. Lediglich auf der letzten Stufe des Experiments unterscheiden sich die beiden Verfahren: Bei den Messungen zur ATP-Hydrolyse wurde die Aktivkohle-Suspension nach dem Schütteln nicht filtriert, sondern 5 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei 4° C zentrifugiert. Anschließend wurde die Radioaktivität des Überstandes gemessen.

7.9. Messung der [^{14}C]-ATP-Hydrolyse

Die Hydrolyse von [^{14}C]-ATP durch SRS wurde quenched-flow-kinetisch untersucht. Für diese Experimente wurde ebenfalls der Standard-Puffer verwendet. Unmittelbar vor den quenched-flow-Messungen wurde [^{14}C]-ATP nach (117) durch Säulenchromatographie an DEAE-Sephacel bei 4° C nachgereinigt, um den Gehalt der Lösung an [^{14}C]-AMP (ca. 1 %) zu verringern. Die ATP-Fraktion der DEAE-Sephacel-Chromatographie wurde über Molekularsieb-Chromatographie an Sephadex G-10 bei 4° C entsalzt und mittels Lyophilyse konzentriert. Nach dieser Prozedur betrug die Verunreinigung der ATP-Lösung mit AMP weniger als 0,05 %. Im Anschluß an die quenched-flow-Messung wurde die Produktlösung auf eine PEI-Cellulose-Säule (Säulenvolumen 2 ml) aufgetragen. Die Säule wurde bei 4° C mit 1 M Ameisensäure gewaschen. Unter diesen Bedingungen wurden nur AMP und Seryl-AMP, nicht aber ATP eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen à 400 µl aufgefangen und auf seine Radioaktivität geprüft. Blindwerte der ATP-Hydrolyse wurden in Abwesenheit von Serin oder von SRS gemessen.

7.1o. Nachweis von Enzym-gebundenem Seryl-Adenylat durch Adsorption an Nitrocellulose-Membranfilter

Der Adenylat-Komplex wurde durch Inkubation von SRS mit Serin und ATP bei 25° C im Standard-Puffer hergestellt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurde der Reaktionsansatz (1oo µl), soweit nicht anders angegeben, mit 1 ml einer eiskalten Lösung (Waschpuffer) von 2o mM Tris-HCL, 2o mM EDTA, 1 mM GSH, o,5 M KCl, pH 7,o, versetzt und über zwei übereinandergelegte Nitrocellulose-Filter abfiltriert, die zuvor mit 5 ml des eiskalten Waschpuffers gespült worden waren. Ausschlaggebend für eine quantitative Adsorption des Adenylat-Komplexes war eine möglichst langsame Filtration. Die Filter wurden mit 3 x 5 ml eiskaltem Waschpuffer nachgewaschen. Nach dem Trocknen wurde die Radioaktivität der Filter einzeln gemessen. Eine geringe Radioaktivität des unteren Filters (dem Blindwert entsprechend) diente als Bestätigung für eine korrekte Filtration. Blindwerte des Adenylat-Nachweises wurden bei Verwendung von radioaktivem Serin in Abwesenheit von ATP, bei Verwendung von radioaktivem ATP in Abwesenheit von Serin gemessen.

Um die Effizienz der Komplexbindung an die Nitrocellulose-Membran zu kontrollieren, wurde der Seryl-Adenylat-Komplex auch über Molekularsieb-Chromatographie isoliert. Dazu wurde eine Sephadex G-25-Säule (Höhe 3o cm, Durchmesser o,9 cm) mit dem Waschpuffer äquilibriert. 3oo µl des in Kap. 4.1.1. angegebenen Reaktionsansatzes wurden auf die Säule aufgetragen, anschließend wurde mit dem Waschpuffer eluiert. Die Fraktionen (2oo µl) wurden auf ihren Proteingehalt (Extinktion bei 28o nm) und auf ihre Radioaktivität geprüft.

7.11. Berechnung der verwendeten Reaktionsmodelle

Für die quantitative Auswertung der gemessenen Zeitkurven der Produktbildung während der Anlaufphase der Aminoacylierung wurden zwei verschiedene Reaktionsmodelle verwendet (Kap. 3.2.2. und 3.2.4.).

Das in Kap. 3.2.2. dargestellte Modell läßt sich mit vier Differentialgleichungen beschreiben (zur Erklärung der Symbole s. Abb. 3.7. und S. 33):

$$\frac{d[C_1]}{dt} + k_1 \cdot [C_1] = 0 \qquad (1)$$

$$\frac{d[C_2]}{dt} - k_1 \cdot [C_1] + k_2 \cdot [C_2] = 0 \qquad (2)$$

$$\frac{d[C_3]}{dt} - k_2 \cdot [C_2] = 0 \qquad (3)$$

$$\frac{d[\text{Produkt}]}{dt} - k_2 \cdot [C_2] - k_s \cdot [C_3] = 0 \qquad (4)$$

Die Integration der Gleichungen (1) und (2) ergab Ausdrücke für die Zeit-abhängige Konzentration von C_1 und C_2:

$$[C_1]_t = [C_o] \cdot \left[\frac{k_2 - \lambda_1}{\lambda_2 - \lambda_1} \cdot e^{-\lambda_1 t} - \frac{k_2 - \lambda_2}{\lambda_2 - \lambda_1} \cdot e^{-\lambda_2 t} \right] \qquad (5)$$

$$[C_2]_t = [C_o] \cdot \frac{k_1}{\lambda_2 - \lambda_1} \cdot \left[e^{-\lambda_1 t} - e^{-\lambda_2 t} \right] \qquad (6)$$

mit $\lambda_{1,2} = 0{,}5 \cdot ((k_1 + k_2) \pm ((k_1 + k_2)^2 - 4\, k_1\, k_2)^{1/2})$

und $[C_1] = [C_o]$, $[C_2] = [C_3] = 0$ für $t = 0$.

Gleichung (6) wurde für die Integration von Gleichung (3) benutzt:

$$[C_3]_t = [C_o] \cdot \frac{k_1 \cdot k_2}{\lambda_2 - \lambda_1} \cdot \left[\frac{\lambda_2 - \lambda_1}{\lambda_1 \cdot \lambda_2} - \frac{1}{\lambda_1} \cdot e^{-\lambda_1 t} + \frac{1}{\lambda_2} \cdot e^{-\lambda_2 t} \right] \qquad (7)$$

Gleichung (7) beschreibt die Produktbildung während des ersten Reaktionszyklus der Synthetase. Die Produktkonzentration zu einem beliebigen Zeitpunkt sowohl während der Anlaufphase als auch im quasi-stationären Zustand der Aminoacylierung wird durch Gleichung (8) angegeben, die durch Integration von Gleichung (4) unter Berücksichtigung der Gleichungen (6) und (7) erhalten wurde:

$$[\text{Produkt}]_t = [C_o] \cdot \frac{k_1 \cdot k_2}{\lambda_2 - \lambda_1} \cdot \left[\frac{\lambda_2 - \lambda_1}{\lambda_1 \cdot \lambda_2} \cdot (1 + k_s t) + \left(\frac{k_s}{\lambda_1^2} - \frac{1}{\lambda_1}\right) \cdot e^{-\lambda_1 t} - \left(\frac{k_s}{\lambda_2^2} - \frac{1}{\lambda_2}\right) \cdot e^{-\lambda_2 t} + \frac{\lambda_1^2 - \lambda_2^2}{\lambda_1^2 \cdot \lambda_2^2} \cdot k_s \right] \qquad (8)$$

Für das in Kap. 3.2.4. beschriebene Reaktionsmodell ergab sich aus einer analog zu den vorstehenden Berechnungen durchgeführten Kalkulation der Ausdruck für die Zeitabhängigkeit der Produktkonzentration zu:

$$[\text{Produkt}]_t = [C_o] \cdot \left[k_s \cdot t + \left(1 - \frac{k_s}{k_{Tr}}\right) + \left(\frac{k_s}{k_{Tr}} - 1\right) \cdot e^{-k_{Tr} \cdot t} \right] \qquad (9)$$

Die Berechnung der theoretischen Zeitkurven der Produktbildung nach Gleichung (8) oder (9) und die Anpassung an die experimentellen Daten wurden mit einem Tischcomputer (Hewlett-Packard 982o A) mit angeschlossenem Schreiber (9862 A) durchgeführt.

8. ZUSAMMENFASSUNG

In einer ersten Reihe von Experimenten wurde der Versuch unternommen, Phenylalanyl-tRNA-Synthetase (PRS) unter weitgehender Erhaltung der enzymatischen Aktivität mit fluoreszierenden Farbstoffen spezifisch zu markieren. An der markierten Synthetase sollte die Bindung und Umsetzung der niedermolekularen Substrate fluorimetrisch verfolgt werden, ausserdem sollte über Energie-Transfer-Messungen mit fluoreszierender $tRNA^{Phe}$ die Topologie des aktiven Zentrums untersucht werden. Es zeigte sich jedoch, daß mit den verwendeten Farbstoffen, 6-(p-Toluidino)-naphthalin-2-sulfonat und N-(3-Pyren)-maleinimid, weder die Selektivität der Markierung noch die Empfindlichkeit des eingeführten Fluoreszenzsignals ausreichend waren, um die geplanten Untersuchungen durchführen zu können.

Im Hauptteil der Arbeit wurde die Reaktionskinetik von Seryl-tRNA-Synthetase (SRS) und PRS in der Anlaufphase der Aminoacylierung mit Hilfe der quenched-flow-Technik analysiert. Die Auswertung der gemessenen Zeitkurven ergab Geschwindigkeitskonstanten für einzelne Teilschritte der Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$ und $tRNA^{Phe}$. An SRS wurden außerdem mit konventionellen Methoden Untersuchungen zur Kinetik der Aktivierung von Serin, zur Gleichgewichtskonzentration des aktivierten Komplexes sowie zur Kinetik der Aminoacylierung im quasi-stationären Zustand durchgeführt.

Die folgenden Elemente des Reaktionsmechanismus von SRS konnten aufgeklärt werden:

a) Relativ langsam laufen Prozesse ab, die mit der Substratbindung verknüpft sind und die sich als Konformationsumwandlungen von Enzym-Substrat-Komplexen interpretieren

lassen. Unter Konzentrationsbedingungen, bei denen die starken Substratbindungsstellen der SRS weitgehend gesättigt sind und die Wechselzahl der Synthetase etwa 1 s^{-1} beträgt (Standardbedingungen (Abb. 3.5.)), besitzt die Geschwindigkeitskonstante für die Gesamtheit dieser Vorgänge einen Wert von 12 s^{-1}, für einzelne Prozesse im Zusammenhang mit der ATP-Bindung oder der Assoziation von Serin und $tRNA^{Ser}$ einen Wert von 17 s^{-1} bzw. 45 s^{-1}.

b) Geschwindigkeitslimitierend für die Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$ ist die Aktivierung von Serin; die zugehörige Geschwindigkeitskonstante hat unter Standardbedingungen einen Wert von ca. 1,2 s^{-1}. In Abwesenheit von $tRNA^{Ser}$ ist die Geschwindigkeit der Aktivierung um eine Größenordnung höher. SRS bildet, in Gegenwart von Pyrophosphatase, 1 Mol Seryl-Adenylat pro Mol Synthetase, folglich ist unter den angewandten experimentellen Bedingungen nur ein katalytisches Zentrum aktiv. Die Aminosäure-Bindung und -Aktivierung erfolgt mit hoher Spezifität.

c) Serin wird von einem präformierten Seryl-Adenylat-Komplex schnell und mit einer Ausbeute von mehr als 9o % auf $tRNA^{Ser}$ übertragen. Die Assoziationskonstante für die Bindung von $tRNA^{Ser}$ an den aktivierten Komplex entspricht dem K_M-Wert der $tRNA^{Ser}$. Die Geschwindigkeitskonstante des Transfers unter Standardbedingungen (35 s^{-1}) beschreibt im wesentlichen die Bindung der $tRNA^{Ser}$ an den aktivierten Komplex, die nachfolgende Veresterung läuft rascher ab. Die Geschwindigkeitskonstante ist abhängig von der Serinkonzentration; es existieren offenbar Wechselwirkungen zwischen dem katalytischen Zentrum und einer zweiten Serinbindungsstelle. Die Gegenwart unfraktionierter Hefe-tRNA hat keinen Einfluß auf die Kinetik des Transfers, die Auswahl der zugehörigen tRNA erfolgt also sehr rasch.

d) Die Dissoziation der Seryl-tRNA^{Ser}, die durch die Bindung unbeladener tRNA^{Ser} induziert wird, ist mit einer Geschwindigkeitskonstante von 7o s^{-1} ebenfalls ein schneller Teilschritt der Aminoacylierung.

e) Aus b) und c) sowie aus Untersuchungen zur Ionenstärke-Abhängigkeit der Reaktionskinetik von SRS ergibt sich, daß die Aminoacylierung im quasi-stationären Zustand mit unterschiedlicher Geschwindigkeit erfolgt, je nachdem ob tRNA^{Ser} bereits vor der Aktivierung oder erst danach an die Synthetase bindet.

Die Untersuchungen an PRS ergaben folgende Aufschlüsse über den Reaktionsmechanismus der Synthetase:

a) Die Bindung der Substrate erfolgt so schnell, daß dieser Prozeß mit der quenched-flow-Technik nicht analysiert werden kann.

b) Die Geschwindigkeitskonstante der Aktivierung von Phenylalanin in Gegenwart von tRNA^{Phe} beträgt bei hohen Substratkonzentrationen (Abb. 5.1.) 85 s^{-1}, die Aktivierung läuft unter diesen Bedingungen wesentlich rascher ab als die vollständige Aminoacylierung (Wechselzahl 9 s^{-1}). Bei niedrigen Konzentrationen an ATP und Phenylalanin (Abb. 5.2.) ist die Aktivierung mit einer Geschwindigkeitskonstante von 1 s^{-1} dagegen geschwindigkeitslimitierend für die Aminoacylierungsreaktion (o,8 s^{-1}).

c) Der geschwindigkeitsbestimmende Teilschritt bei hohen Substratkonzentrationen ist der Transfer von aktiviertem Phenylalanin auf tRNA^{Phe}, seine Geschwindigkeitskonstante besitzt einen Wert von 16 s^{-1}. Auch bei niedriger ATP- und Aminosäurekonzentration beträgt die Geschwindigkeitskonstante des Transfers unverändert 16 s^{-1}.

d) Die Dissoziation der Phenylalanyl-tRNA^{Phe} ist ein schneller Prozeß, der die Aminoacylierungsgeschwindigkeit nicht limitiert.

Die Befunde bestätigen die Rolle von Aminoacyl-Adenylat als Zwischenprodukt der Aminoacylierung von $tRNA^{Ser}$ und $tRNA^{Phe}$, allerdings kann im Falle der SRS bei hohen Konzentrationen an $tRNA^{Ser}$ und Serin eine konzertierte Aminoacylierungsreaktion nicht ausgeschlossen werden. Die Reaktionsmechanismen von SRS und PRS sind sich unter Bedingungen, bei denen an beiden Synthetasen nur ein katalytisches Zentrum mit Substraten besetzt ist, hinsichtlich der Kinetik der einzelnen Teilschritte der Aminoacylierung sehr ähnlich. Die Besetzung eines zweiten katalytischen Zentrums bei PRS übt jedoch einen starken Einfluß auf die Geschwindigkeit der Aktivierung von Phenylalanin aus, so daß bei höheren Substratkonzentrationen ein Wechsel im geschwindigkeitsbegrenzenden Schritt der Aminoacylierung von $tRNA^{Phe}$ auftritt.

9. Literaturverzeichnis

1. D. Söll und P. R. Schimmel,
in: The Enzymes (Hrsg. P. D. Boyer), Academic Press,
New York, 3. Auflage, Bd. 1o, 489 - 538 (1974).

2. L. L. Kisselev und O. O. Favorova,
Adv. Enzymology 4o, 141 - 238 (1974).

3. M. H. Makman und G. L. Cantoni,
Biochemistry 4, 434 - 442 (1965).

4. R. Rigler, E. Cronvall, R. Hirsch, U. Pachmann und
H. G. Zachau,
FEBS Letters 11, 32o - 323 (197o).

5. H. Heider, E. Gottschalk und F. Cramer,
Eur. J. Biochem. 2o, 144 - 152 (1971).

6. G. Krauss, A. Pingoud, D. Boehme, D. Riesner,
F. Peters und G. Maass,
Eur. J. Biochem. 55, 517 - 529 (1975).

7. R. Hirsch und H. G. Zachau,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 5o9 - 526 (1976).

8. G. Engel, H. Heider, A. Maelicke, F. von der Haar
und F. Cramer,
Eur. J. Biochem. 29, 257 - 262 (1972).

9. U. Pachmann, E. Cronvall, R. Rigler, R. Hirsch,
W. Wintermeyer und H. G. Zachau,
Eur. J. Biochem. 39, 265 - 273 (1973).

1o. R. Rigler, U. Pachmann, R. Hirsch und H. G. Zachau,
Eur. J. Biochem. 65, 3o7 - 315 (1976).

11. D. Riesner, A.M. Pingoud, D. Boehme, F. Peters
und G. Maass,
Eur. J. Biochem. 68, 71 - 8o (1976).

12. H. S. Hertz und H. G. Zachau,
Eur. J. Biochem. 37, 2o3 - 213 (1973);
H. G. Zachau und H. S. Hertz,
Eur. J. Biochem. 44, 289 - 291 (1974).

13. A. Maelicke und F. Cramer,
Eur. J. Biochem. 52, 171 - 178 (1975).

14. W. Hörz und H. G. Zachau,
Eur. J. Biochem. 32, 1 - 14 (1973).

15. W. Wübbeler, C. Lossow, F. Fittler und H. G. Zachau,
Eur. J. Biochem. 59, 4o5 - 413 (1975).

16. F. Cramer, H. Faulhammer, F. von der Haar,
M. Sprinzl und H. Sternbach,
FEBS Lett. 56, 212 - 214 (1975).

17. W. Freist, F. von der Haar, M. Sprinzl und F. Cramer,
Eur. J. Biochem. 64, 389 - 394 (1976).

18. F. von der Haar und F. Cramer,
Biochemistry 17, 3139 - 3145 (1978).

19. U. Pachmann und H. G. Zachau,
Nucl. Acids Res. 5, 961 - 973 (1978).

2o. W. Hörz, D. Meyer und H. G. Zachau,
Eur. J. Biochem. 53, 533 - 539 (1975).

21. U. Pachmann und H. G. Zachau,
Nucl. Acids Res. 5, 974 - 985 (1978).

22. J. Schmidt, R. Wang, S. Stanfield und B. J. Reid,
Biochemistry 1o, 3264-32 (1971).

23. J. M. Berther, P. Mayer und H. Dutler,
Eur. J. Biochem. 47, 151 - 163 (1974).

24. F. Fasiolo, P. Remy, J. Pouyet und J. P. Ebel,
Eur. J. Biochem. 5o, 227 - 236 (1974).

25. F. Fasiolo, N. Befort, Y. Boulanger und J. P. Ebel,
Biochim. Biophys. Acta 217, 3o5 - 318 (197o).

26. S. Robbe-Saul, F. Fasiolo und Y. Boulanger,
FEBS Letters 84, 57 - 62 (1977).

27. F. Fasiolo und J. P. Ebel,
Eur. J. Biochem. 49, 257 - 263 (1974).

28. R. Thiebe,
FEBS Letters 6o, 342 - 345 (1975).

29. R. Thiebe, K. Harbers und H. G. Zachau,
Eur. J. Biochem. 26, 144 - 152 (1972).

30. B. Roe, M. Sirover und B. S. Dudock,
Biochemistry 12, 4146 - 4154 (1973).

31. A. Dietrich, D. Kern, J. Bonnet, R. Giege
und J. P. Ebel,
Eur. J. Biochem. 70, 147 - 158 (1976).

32. G. L. Igloi, F. von der Haar und F. Cramer,
Biochemistry 17, 3459 - 3468 (1978).

33. G. Krauss, D. Riesner und G. Maass,
Eur. J. Biochem. 68, 81 - 93 (1976).

34. P. Mayer,
Diss. ETH Nr. 5089 (1973).

35. F. Fasiolo, J. P. Ebel und M. Lazdunski,
Eur. J. Biochem. 73, 7 - 15 (1977).

36. R. Thiebe,
Nucl. Acids Res. 5, 2055 - 2071 (1978).

37. A. Pingoud, D. Riesner, D. Boehme und G. Maass,
FEBS Letters 30, 1 - 5 (1973).

38. G. Krauss, R. Römer, D. Riesner und G. Maass,
FEBS Letters 30, 6 - 10 (1973).

39. R. Rigler, M. Cronvall, M. Ehrenberg, U. Pachmann,
R. Hirsch und H. G. Zachau,
FEBS Letters 18, 193 - 198 (1971).

40. W. O. McClure und G. M. Edelman,
Biochemistry 5, 1908 - 1918 (1966).

41. L. Brand und J. R. Gohlke,
Ann. Rev. Biochem. 41, 843 - 868 (1972).

42. C. J. Selikar und L. Brand,
J. Am. Chem. Soc. 93, 5405 - 5414 (1971).

43. E. Lippert, W. Lüder, F. Moll, W. Nägele, H. Boos,
H. Prigge und I. Seibold-Blankenstein,
Angew. Chem. 73, 695 - 706 (1961).

44. E. M. Kosower und H. Dodink,
J. Am. Chem. Soc. 96, 6195 - 6196 (1974).

45. E. Holler und H. M. Kosakowski,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 1532 - 1539 (1973).

46. H. M. Kosakowski und E. Holler,
Eur. J. Biochem. 38, 274 - 282 (1973).

47. G. S. Eadie,
J. Biol. Chem. 146, 85 - 93 (1942).

48. G. Scatchard,
Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660 - 672 (1949).

49. D. E. Atkinson, J. A. Hathaway und E. C. Smith,
J. Biol. Chem. 240, 2682 - 2690 (1965).

50. J. K. Weltman, R. P. Szaro, A. R. Frackelton,
R. M. Dowben, J. R. Bunting und R. E. Cathon,
J. Biol. Chem. 248, 3173 - 3178 (1973).

51. D. G. Smyth, A. Nagamatsu und J. S. Freiton,
J. Am. Chem. Soc. 82, 4600 - 4604 (1960).

52. C. W. Wu, L. R. Yarbrough und F. Y.-H. Wu,
Biochemistry 15, 2863 - 2868 (1976).

53. A. R. Fersht und R. Jakes,
Biochemistry 14, 3350 - 3356 (1975).

54. A. R. Fersht und M. M. Kaethner,
Biochemistry 15, 818 - 823 (1976).

55. A. R. Fersht und M. M. Kaethner,
Biochemistry 15, 3342 - 3346 (1976).

56. A. R. Fersht, Biochemistry 16, 1025 - 1030 (1977).

57. T. N. E. Lovgren, J. Heinonen und R. B. Loftfield,
J. Biol. Chem. 250, 3854 - 3860 (1975).

58. U. Lagerkvist, B. Åkesson und R. Brändén,
J. Biol. Chem. 252, 1002 - 1006 (1977).

59. T. E. Barman und H. Gutfreund,
in: Rapid Mixing and Sampling Techniques in Biochemistry (Hrsg. B. Chance et al.), Academic Press,
New York, 339 - 344 (1964).

60. A. Kröger und M. Klingenberg,
Eur. J. Biochem. 34, 358 - 368 (1973).

61. A. Adams und H. G. Zachau,
Eur. J. Biochem. 5, 556 - 558 (1968).

62. H. G. Zachau,
Eur. J. Biochem. 5, 559 - 566 (1968).

63. K. Randerath und E. Randerath,
J. Chromatogr. 16, 111 - 125 (1964).

64. P. von Hippel und K.-Y. Wong,
Science 145, 577 - 58o (1964).

65. D. R. Robinson und W. P. Jencks,
J. Am. Chem. Soc. 87, 247o - 2479 (1965).

66. H. G. Bluestein, C. C. Allende, J. E. Allende und
G. L. Cantoni,
J. Biol. Chem. 243, 4693 - 4699 (1968).

67. A. T. Norris und P. Berg,
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 52, 33o - 337 (1964).

68. U. Lagerkvist und J. Waldenström,
J. Biol. Chem. 241, 5391 - 54oo (1966).

69. M. Yarus und P. Berg,
J. Mol. Biol. 28, 479 - 49o (1967).

7o. R. S. Mulvey und A. R. Fersht,
Biochemistry 16, 4oo5 - 4o13 (1977).

71. J. Josse,
J. Biol. Chem. 241, 1938 - 1947 (1966).

72. U. Pachmann,
unveröffentlichte Ergebnisse.

73. J. G. Chirikjian, H. T. Wright und J. P. Fresco,
J. Bio. Chem. 248, 1o74 - 1o79 (1973).

74. C. S. Lin, R. Irwin und J. G. Chirikjian,
Nucl. Acids Res. 6, 3651 - 366o (1979).

75. P. Rouget und F. Chapeville,
Eur. J. Biochem. 14, 498 - 5o8 (197o).

76. G. L. Igloi, F. von der Haar und F. Cramer,
Biochemistry 16, 1696 - 17o2 (1977).

77. M. Yarus,
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 69, 1915 - 1919 (1972).

78. E. W. Eldred und P. R. Schimmel,
Biochemistry 11, 17 - 23 (1972).

79. R. Thiebe und H. G. Zachau,
Biochim. Biophys. Acta 217, 294 - 3o4 (197o).

8o. F. Fasiolo und A. R. Fersht,
Eur. J. Biochem. 85, 85 - 88 (1978).

81. G. Krauss, St. M. Coutts, D. Riesner und G. Maass,
Biochemistry 17, 2443 - 2449 (1978).

82. G. Krauss, F. von der Haar und F. Cramer,
Biochemistry 18, 4755 - 4766 (1979).

83. F. von der Haar und F. Cramer,
Biochemistry 17, 45o9 - 4514 (1978).

84. U. J. Hänggi, R. E. Streeck, H. P. Voigt und
H. G. Zachau,
Biochim. Biophys. Acta 217, 287 - 293 (197o).

85. M. Ehrenberg, R. Rigler und W. Wintermeyer,
Biochemistry 18, 4588 - 4599 (1979).

86. R. Ehrlich, J. F. Lefevre und P. Remy,
Eur. J. Biochem. 1o3, 145 - 153 (198o).

87. R. S. Mulvey und A. R. Fersht,
Biochemistry 17, 5591 - 5597 (1978).

88. A. R. Fersht, J. Gangloff und G. Dirheimer,
Biochemistry 17, 374o - 3746 (1978).

89. M. Yarus und P. Berg,
J. Mol. Bio. 42, 171 - 189 (1969).

9o. C. Hélène, F. Brun und M. Yaniv,
J. Mol. Biol. 58, 349 - 365 (1971).

91. M. H. Makman und G. L. Cantoni,
Biochemistry 5, 2246 - 2254 (1966).

92. I. Pilz, F. Malnig, O. Kratky und F. von der Haar,
Eur. J. Biochem. 75, 35 - 42 (1977).

93. R. Loftfield und E. A. Eigner,
J. Biol. Chem. 244, 1746 - 1754 (1969).

94. A. Pastuszyn und R. B. Loftfield,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 775 - 783 (1972).

95. H. Jakubowski, A. Pastuszyn und R. B. Loftfield,
Biochim. Biophys. Acta 52o, 568 - 576 (1978).

96. P. Remy und J. P. Ebel,
FEBS Lett. 61, 28 - 31 (1976).

97. G. K. Kovaleva, S. G. Moroz, O. O. Favorova und
L. L. Kisselev,
FEBS Lett. 95, 81 - 84 (1978).

98. A. Fersht,
Enzyme Structure and Mechanism, W. H. Freeman und
Co. 1977, S. 191.

99. M. Lazdunski, C. Petitclerc, D. Chappelet
und C. Lazdunski,
Eur. J. Biochem. 2o, 124 - 139 (1971).

loo. A. N. Baldwin und P. Berg,
J. Biol. Chem. 241, 839 - 845 (1966).

lol. F. H. Bergmann, P. Berg und M. Dieckmann,
J. Biol. Chem. 236, 1735 - 174o (1961).

lo2. R. B. Loftfield und D. Vanderjagt,
Biochem. J. 128, 1353 - 1356 (1972).

lo3. F. von der Haar und F. Cramer,
Biochemistry 15, 4131 - 4138 (1976).

lo4. J. W. Anderson und L. Fowden,
Biochem. J. 119, 691 - 697 (197o).

lo5. A. R. Fersht und C. Dingwall,
Biochemistry 18, 125o - 1256 (1979).

lo6. F. von der Haar,
Eur. J. Biochem. 34, 84 - 9o (1973).

lo7. U. K. Laemmli,
Nature 227, 68o - 685 (197o).

1o8. W. Wintermeyer und H. G. Zachau,
FEBS Lett. 58, 3o6 - 3o9 (1975).

1o9. F. Fittler, J. Kruppa und H. G. Zachau,
Biochim. Biophys. Acta 277, 513 - 522 (1972).

11o. D. Schneider, R. Solfert und F. von der Haar,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353,
133o - 1336 (1972).

111. W. M. Holmes, R. E. Hund, B. R. Reid,
R. A. Rimerman und G. W. Hatfield,
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 72, 1o68 - 1o71 (1975).

112. R. L. Pearson, J. F. Weiss und A. D. Kelmers,
Biochim. Biophys. Acta 228, 77o - 774 (1971).

113. H. Bünemann und W. Müller,
Nucl. Acids Res. 5, 1o59 - 1o74 (1978).

114. H. G. Zachau, D. Dütting und H. Feldmann,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 347,
212 - 235 (1966).

115. J. Kruppa und H. G. Zachau,
Biophys. Acta 277, 499 - 512 (1972).

116. R. Thiebe und R. Hirsch,
FEBS Lett. 6o, 338 - 341 (1975).

117. DEAE-Sephacel, Pharmacia Fine Chemicals AB,
Uppsala, S. 11 (1977).

118. Eur. J. Biochem. 74, 1 - 6 (1977).

1o. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

A_{260}	Extinktion bei 260 nm und 1 cm Schichtdicke
AA	Aminosäure
AA-AMP	Aminoacyl-Adenylat
AA-tRNA	Aminoacyl-tRNA
cpm	Impulse pro Minute
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
NPM	N-(3-Pyren)-maleinimid
PPase	anorganische Pyrophosphatase
PRS	Phenylalanyl-tRNA-Synthetase (heute wird auch zunehmend die Abkürzung FTS verwendet, diese Bezeichnung ist jedoch noch nicht allgemein eingeführt)
RNase	Ribonuklease
SRS	Seryl-tRNA-Synthetase (STS, s. PRS)
TCA	Trichloressigsäure
TNS	6-(p-Toluidino)-naphthalin-2-sulfonat
v	Reaktionsgeschwindigkeit
Vol.	Volumen

Alle anderen Abkürzungen entsprechen den Empfehlung der IUPAC-IUB (118).

L E B E N S L A U F

Am 26. September 1948 wurde ich als zweites Kind des Arztes Leif Dibbelt und seiner Ehefrau Rosemarie in Düsseldorf geboren. Dort besuchte ich ab 1955 die Volksschule und von 1959 bis 1968 das humanistische Humboldt-Gymnasium. Zum Wintersemester 1968/69 begann ich das Chemiestudium an der Universität Münster, wurde jedoch nach wenigen Monaten zur Bundeswehr eingezogen. Nach Ableistung des Wehrdienstes studierte ich ab Wintersemester 197o/71 Chemie an der Universität Bochum. Nach fünf Semestern wechselte ich an die Universität München, wo ich im Dezember 1975 die Diplom-Prüfung ablegte. Anschließend fertigte ich am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München unter Anleitung von Prof. Zachau meine Diplomarbeit an und arbeitete seit Januar 1977 im selben Institut an der vorliegenden Dissertation.